



**INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO**

Maria Fernandes Martins

Avaliação da resistência de linhagens de Feijoeiro ao Nemátode *Meloidogyne javanica* e
ao Fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*

Mestrado em Agricultura Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação:

Orientadora: Professora Doutora Maria Luísa Roldão Marques Moura
Co-Orientadora: Doutora Sofia Rocha Costa

Novembro de 2015

**As doutrinas expressas neste
trabalho são da exclusiva
responsabilidade
do autor.**

Aos meus pais
À Teresinha e Carolina
Ao Fernando
Aos meus amigos

Índice

RESUMO.....	v
ABSTRAT.....	vii
AGRADECIMENTOS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE QUADROS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - A cultura do feijão-verde.....	1
1.1.1- Origem e história do feijão-verde.....	1
1.1.2 - Classificação Botânica.....	2
1.1.3 - Morfologia e estados fenológicos da planta.....	2
1.1.4 - Preferências edafoclimáticas.....	5
1.1.5 - Doenças do Feijoeiro.....	6
1.1.6 -Valor alimentar e composição nutricional.....	8
1.1.7 -Produção e Comercialização de Feijão-verde.....	9
1.2 -A enxertia em horticultura.....	10
1.2.1 - Propriedades de um Porta-Enxerto.....	11
1.2.2 - Potencialidades e constrangimentos da enxertia	11
1.2.3- Enxertia de culturas hortícolas em Portugal	14
1.3 – Nemátodes-das-galhas-radiculares <i>Meloidogyne</i> spp.....	15
1.3.1- Ciclo de vida.....	16
1.3.2 – Sintomas.....	18
1.3.3- Medidas de proteção.....	19
1.4 – Fusariose vascular do feijoeiro.....	20
1.4.1 – Sintomas.....	21
1.4.2 – Caraterísticas culturais e morfológicas.....	22
1.4.3 –Epidemiologia.....	23
1.4.4 – Meios de proteção.....	24

1.5 – Objetivos do trabalho.....	25
2 – MATERIAS E MÉTODOS.....	26
2.1- Localização e preparação dos ensaios.....	26
2.2- Ensaio da avaliação da resistência de linhagens de feijoeiro ao nemátode <i>Meloidogyne javanica</i>	26
2.2.1- Obtenção do material vegetal.....	26
2.2.2- Desenho experimental	27
2.2.3-Práticas culturas.....	28
2.2.3.1- Preparação dos vasos.....	28
2.2.3.2- Transplantação.....	29
2.2.3.3- Tutoragem.....	29
2.2.3.4- Rega.....	30
2.2.3.5- Desponta.....	30
2.2.4- Avaliação das plantas-parte aérea e raízes.....	30
2.2.5 Inoculação do nemátode <i>Meloidogyne javanica</i>	31
2.2.5.1- Obtenção e preparação do inóculo.....	31
2.2.5.2- Inoculação das plantas.....	32
2.2.6- Avaliação da resistência ao nemátode <i>Meloidogyne javanica</i>	32
2.2.6.1 – Determinação do índice de galhas e massas de ovos e do fator de reprodução.....	32
2.2.6.2 – Avaliação da resistência.....	34
2.3 – Ensaio da avaliação da resistência de linhagens de feijoeiro ao <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	35
2.3.1- Material vegetal.....	35
2.3.2- Desenho experimental.....	35
2.3.3- Inoculação das plantas com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	36
2.3.3.1- Pré-germinação de sementes.....	36
2.3.3.2- Isolamento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	36
2.3.3.3- Preparação de inóculo e inoculação de plantas.....	37
2.3.3.4 - Inoculação das raízes e transplantação para vasos.....	37
2.3.4 – Práticas culturais.....	38

2.3.5- Avaliação da resistência ao <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	38
2.3.6- Avaliação da colonização dos tecidos internos do caule de feijão.....	39
2.3.7- Identificação de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	39
2.4 - Análise estatística.....	40
3- Resultados.....	41
3.1- Avaliação da resistência/tolerância de linhagens de feijoeiro a nematode <i>Meloidogyne javanica</i>	41
3.2- Avaliação da resistência/tolerância a linhagens de feijoeiro ao <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	46
3.2.1 – Sintomas de fusariose vascular do feijoeiro.....	46
3.2.2 – Isolamento e identificação de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> ..	48
3.2.3 – Reação de linhagens de feijoeiro a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	50
4- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	53
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS	

RESUMO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado há centenas de anos, e continua a ser em muitas regiões do mundo, a leguminosa mais consumida na dieta humana. No feijão-verde o produto final para consumo é a vagem, um alimento rico em fibras, proteínas, ferro, vitaminas e sais minerais. A produção de feijão diminuiu nos últimos anos sendo os fatores mais importantes da queda de produtividade, as doenças que infetam esta cultura, que podem provocar perdas de produção até 100 %. Entre os agentes patogénicos que contribuem para a baixa produtividade da cultura salientam-se os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR) *Meloidogyne* sp. e o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (Fop) responsável pela marchidão vascular do feijoeiro. A estratégia mais viável para o controle destes patogénios do solo é o uso de cultivares resistentes, que podem ser utilizados como porta-enxertos de cultivares comerciais suscetíveis.

Com este trabalho pretendeu-se avaliar a resistência/suscetibilidade de linhagens de feijoeiro aos agentes patogénicos de origem edáfica identificados acima, com testes-padrão em condições controladas, com o objetivo geral de identificar linhagens com potencial utilização como porta-enxertos de feijoeiro.

As linhagens X08, X09, X10, X15 e de *Phaseolus coccineus* foram suscetíveis ao NGR *Meloidogyne javanica*, ao permitirem a reprodução de nemátodes e sofrerem danos significativos nas raízes. No entanto foi possível detetar um potencial de resistência na linhagem X09, que registou valores mais baixos de galhas, massas de ovos e reprodução dos nemátodes, comparável à reprodução de NGR em feijoeiros resistentes. A linhagem X10 foi considerada a mais suscetível, com parâmetros de infeção e multiplicação de nemátodes semelhante aos tomateiros suscetíveis (testemunha positiva). A aplicação de diferentes sistemas de classificação com base em índices resultou em conclusões diferentes quanto à reação a NGR das linhagens avaliadas, sendo importante analisar estatisticamente os valores não-transformados de galhas, massas de ovos, e reprodução para uma caracterização mais objetiva, aprofundada e que permita a comparação com outros estudos.

As plantas de *P. vulgaris* (Oriente) e de *P. coccineus* (Aintree, Emergo, X07, X08, X09, X10 e X15) avaliadas quanto à severidade da doença causada pela estirpe FA-15 de Fop, não manifestaram sintomas da doença até 40 dias após inoculação das raízes. A aplicação da escala de severidade da doença resultou na pontuação 1 (ausência total da doença) para todas as plantas inoculadas e testemunha, sendo portanto resistentes à estirpe FA-15. Estes

resultados contrariam a suscetibilidade observada em condições de produção comercial de feijão-verde da cultivar “Oriente” (testemunha positiva no ensaio em condições controladas) da qual se isolou a estirpe patogénica. Apesar de não se terem observados sintomas de fusariose foi isolado Fop de plantas da linhagem X09 e do substrato, onde o fungo se manteve viável por um período de 60 dias. Os resultados obtidos levantam questões sobre a necessidade de validação das metodologias padrão de análise da resistência a Fop para feijão de trepar, nomeadamente sobre a concentração do inóculo, o tempo de imersão das raízes, e o momento ideal para avaliação da reação das linhagens.

Para que a enxertia possa ser utilizada como uma estratégia eficaz para controlar os NGR e a fusariose vascular do feijoeiro, é determinante conhecer as espécies e/ou raças presentes nas áreas de produção, realizar ensaios com combinação de inoculação de NGR com Fop e ainda realizar ensaios em condições de campo, para avaliar o desempenho das plantas enxertadas no seu ciclo produtivo completo, e o efeito da interação entre plantas e seus agentes patogénicos modulada por condições abióticas típicas da produção comercial.

Palavras-chave: controlo sustentável, ensaio de vasos, enxertia, fusariose vascular, nemátodes-das-galhas-radiculares.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) has been cultivated for hundreds of years, and is the main human-consumed legume in several regions of the world. In runner beans, the main product is the pod, a foodstuff rich in fibre, proteins, vitamins and minerals. In the last few years, there has been a reduction in bean production; the yield drop has been mainly attributed to infection by plant pathogens that can reduce yield up to 100 %. Among the plant pathogens that contribute to lower yields, root-knot nematodes (RKN) *Meloidogyne* spp. and the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (Fop) have prominent roles. The most feasible strategy for the control of these pathogens is the use of resistant cultivars, which can be used as rootstock for susceptible commercial cultivars.

This work aims to assess the resistance/susceptibility of bean plant lines to the above-mentioned soil-borne plant pathogens, through standard methods and in controlled conditions. The main objective is to identify lines that can potentially be used as rootstock for bean plants.

Runner bean *Phaseolus coccineus* lines X08, X09, X10 and X15 supported nematode reproduction whilst suffering significant root damage and were therefore susceptible to the RKN *Meloidogyne javanica*. Nevertheless, a potential for resistance was detected in line X09, which registered the smallest numbers of galls, egg masses and nematode reproduction. Nematode reproduction in this line was comparable to the values obtained for reported RKN-resistant common bean plants. Among all tested lines, line X10 was considered the most susceptible, with parameters on nematode infection and reproduction similar to those obtained for susceptible tomato plants (positive control). The use of different resistance classification systems resulted in different conclusions on the reaction of the tested lines to RKN. It is therefore important to statistically analyse untransformed data on galls, egg masses and reproduction to provide an objective and in-depth characterisation of resistance, which permits comparisons with other studies.

Phaseolus vulgaris (Oriente) and *P. coccineus* (Aintree, Emergo, X07, X08, X09, X10 and X15) plants assessed in disease-severity trials were symptomless up to 40 days after root inoculation with Fop strain FA-15. All the inoculated plants (including control plants) scored 1 (complete absence of symptoms) in the standard disease-severity scale, and were therefore resistant to strain FA-15. These results are not in agreement with the observed susceptibility of runner bean cultivar ‘Oriente’ (positive control in the controlled conditions trial), from

which the pathogenic strain was isolated. Although vascular wilt symptoms were not detected, Fop was successfully isolated from plant roots of line X09 and from the pot substrate, where the fungus survived for 60 days. The obtained results raise the issue on the need to validate standard methods for testing resistance of runner beans to Fop, especially on the inoculum level, time of root immersion, and on the most adequate time to assess the reaction of the plant lines.

In order to use grafting as an efficient strategy for the control of RKN and vascular wilt of bean plants, it is of utmost importance to be aware of the species and/or races of the pathogens in the production areas, to perform assays with the combined inoculation of NGR and Fop. It is also vital to run field trials to assess the performance of grafted plants along their full production cycle and to evaluate the outcomes of plant-pathogen interactions under abiotic conditions typical of a commercial production environment.

Keywords: grafting, pot assays, root-knot nematodes, sustainable control, vascular wilt.

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho só foi possível com a colaboração de distintas pessoas às quais gostaria de expressar o meu profundo reconhecimento e gratidão:

À Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, pelos meios materiais e humanos que dispôs, indispensáveis à realização deste trabalho.

À Professora Doutora Luísa Moura, pela oportunidade, orientação, acompanhamento e ajuda constante prestada em todas as etapas deste trabalho.

À Doutora Sofia Costa, pela co-orientação, pela disponibilidade demonstrada e pela ajuda prestada durante o trabalho.

À Professora Doutora Isabel Abrantes, pela cedência da população de nemátodes-das-galhas-radiculares *Meloidogyne javanica* utilizada neste trabalho.

À empresa Aromas & Flores, pela cedência de sementes de feijoeiro de linhagens em melhoramento.

Ao Eng.º João Moreira da Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro pela colaboração na indicação de estufas de feijoeiro e colheita de material infetado com *Fusarium*.

À empresa Tozer Ibérica SL pela cedência de sementes de feijoeiro comerciais.

Aos meus companheiros de equipa, Cristiana, Diogo, Rúben, Ana Teresa e Simão por toda a partilha de conhecimentos, ajuda e apoio.

Aos funcionários do laboratório da ESAPL, em especial ao Engenheiro Vergílio Peixoto, pela ajuda constante. À D. Maria, à D. Susy e à D. Maria Helena que estiveram sempre disponíveis para me apoiar nas tarefas laboratoriais, apresento também o meu sincero agradecimento.

Ao Engenheiro Durão e aos seus colaboradores, pela preciosa ajuda na realização de todos os trabalhos de campo.

Aos Professores da ESAPL, pelos ensinamentos transmitidos, que muito contribuíram para a minha formação académica.

Aos colegas do Mestrado de Agricultura Biológica, pelos ensinamentos e troca de experiências fundamentais para a minha vida académica.

À minha família, que não poupou esforços para a minha formação, especialmente pelo amor, carinho, dedicação e incentivo constantes, pelo apoio neste trabalho.

Ao Fernando, pelo apoio, incentivo, carinho, paciência e dedicação demonstrados em todos os momentos.

A todos os que, direta ou indiretamente me ajudaram na concretização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST - Basic Local Aligment Search Tool

cm- centímetro

cv. – Cultivar

DAP- Dias após inoculação

ESA – Escola Superior Agrária

ESAPL – Escola Superior Agrária de Ponte de Lima

Fop – *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

g- grama

ha- hectare

INE – Instituto Nacional de Estatística

ISF – International Seed Federation

ITS – Internal Transcribed Spacer

IPVC – Instituto Politécnico de Viana do Castelo

J1- Juvenil

J2 – Jovens de segundo estágio

mg – miligrama

ml - mililitro

mm- milímetro

MPB – Modo de Produção Biológico

NCBI- National Center for Biotechnology Information

NGR- Nemátode das Galhas Radiculares

NPK – Azoto, Fósforo e Potássio

OFR- Oligossacáridos da Família da Rafinose

PDA – Potato Dextrose Agar

t- tonelada

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 - Classificação botânica do feijão.....	2
Quadro 1.2 – Características agronômicas da semente.....	4
Quadro 1.3 – Escala fenológica do Feijão-verde.....	5
Quadro 1.4 – Principais doenças do feijoeiro.....	7
Quadro 1.5 – Composição média do feijão-verde e de feijão seco (grão). Valores expressos por 100g de parte comestível.....	8
Quadro 1.6 - Produção do Feijão-verde nos anos 2012 a 2014.....	9
Quadro 1.7 - Objetivos da enxertia nas culturas de pepino, melancia, melão, tomate e beringela.....	12
Quadro 2.1 – Índice de Massas de Ovos (EI) e índice de Galhas (GI) de Taylor e Sasser (1978).....	33
Quadro 2.2 – Índice de Reprodução Relativa (RI) de Taylor e Sasser (1978).....	33
Quadro 2.3 – Classificação de resistência pelo EI.....	34
Quadro 2.4 – Classificação de resistência pelo RI.....	34
Quadro 2.5 – Avaliação da resistência e tolerância por Sasser <i>et al.</i>	34
Quadro 2.6 - Escala CIAT para avaliação da severidade de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> em feijoeiro.....	38
Quadro 3.1- Índice de massas de ovos, de galhas e de reprodução relativa de <i>Meloidogyne javanica</i> nas linhagens avaliadas. n- número de repetições; EI – índice de massas de ovos; GI – índice de galhas; RI (%) – índice de reprodução relativa, tomando como referência a cultivar X10.....	45
Quadro 3.2 – Fator de reprodução, eficiência do hospedeiro, índice de galhas, danos no hospedeiro e grau de resistência a <i>Meloidogyne javanica</i> nas linhagens analisadas. n- número de repetições; Rf – fator de reprodução; GI - índice de galhas; DR - Grau de Resistência; *os dados apresentados são a média \pm desvio-padrão das repetições analisadas.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Jovens de segundo estágio de nemátodes das galhas radiculares <i>Meloidogyne javanica</i> (ampliação de 40 x) (Costa, 2014).....	16
Figura 1.2- Representação do ciclo de vida <i>Meloidogyne</i> spp. (Adaptado de Jung e Wyss, 1999 citado por Bruinsma, 2013).....	17
Figura 1.3 - Microconídios de <i>F. oxysporum</i> (Ellis, 2015).....	22
Figura 1.4 - Macroconídios de <i>F. oxysporum</i> (Ellis, 2015).....	22
Figura 2.1 – Sementes das linhagens de feijoeiro <i>Phaseolus coccineus</i> utilizadas no ensaio de resistência a <i>Meloidogyne javanica</i>	27
Figura 2.2 – Disposição dos vasos na câmara de crescimento.....	28
Figura 2.3 – Vasos colocados aleatoriamente na câmara.....	29
Figura 2.4 – Vasos do ensaio na câmara de crescimento com estacas de metal e rede.....	30
Figura 2.5 – Vasos do ensaio na câmara de crescimento com estacas de metal e rede.....	30
Figura 2.6 - Disposição dos vasos na câmara de crescimento.....	36
Figura 2.7 - Escala de severidade de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> em feijoeiro (Pereira, 2007).....	39
Figura 3.1- Pesos frescos (g) da parte aérea das plantas das linhagens X08, X19, X10, e X15, 60 dias após a inoculação com 5000 ovos jovens de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i> . N – plantas inoculadas; T- plantas não-inoculadas (testemunha). Os valores são média \pm erro padrão.....	41
Figura 3.2 – Pesos frescos da parte radicular das plantas das linhagens X08, X09, X10 e X15, 60 dias após a inoculação com 5000 ovos e jovens de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i> . N- plantas inoculadas; T- plantas não-inoculadas (testemunha). Os valores são média \pm erro padrão.....	42
Figura 3.3- Proporção percentual de peso seco da parte aérea e da parte radicular das plantas das linhagens X08, X09, X10 e X15, 60 dias após a inoculação com 5000 ovos e jovens de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i> . N- plantas inoculadas; T- plantas não-inoculadas (testemunha).....	42
Figura 3.4- Número de galhas (A) e de massas de ovos (B) produzidas no sistema radicular das plantas das linhagens X08, X09, X10 e X15 resultantes da infecção por <i>Meloidogyne javanica</i> , e fator de reprodução do nematode (C) em relação á população inicial (5000 ovos e jovens de segundo estágio), 60 dias após a inoculação. Os valores são média \pm erro padrão.	

Valores acompanhados da mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com a análise estatística ($p < 0.05$).....	44
Figura 3.5 – Sintomas de fusariose vascular do feijoeiro em plantas da cultivar “Oriente”, a partir das quais se obtiveram vários isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>phaseoli</i> em laboratório : A, B e C – murchidão de plantas na fase de floração e vingamento do fruto. D e E- pormenor de necroses externos no caule onde é evidente a progressão da doença, e murchidão seguida de amarelecimento das folhas. F-Pormenor de corte longitudinal do caule, com sintomas de acastanhamento dos vasos (Imagens por Luísa Moura, abril 2015).	47
Figura 3.6 - Caraterísticas das colónias e micélio de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>phaseoli</i> . A1 e A2- Colónias purificadas obtidas no primeiro isolamento a partir de plantas da cv. “Oriente” em estufa comercial (frente e verso da placa). B1 e B2- Caraterísticas de colónias e micélio de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>phaseoli</i> re-isolado a partir de planta da linhagem X09, 21 dias após inoculação das raízes com a estirpe FA-15 (frente e verso da placa). C1 e C2- Aspeto de crescimentos microbianos obtidos em meio PDA, após isolamento a partir do substrato dos vasos com plantas inoculadas com a estirpe FA-15, 65 dias após inoculação das raízes. C1- pormenor de colónias de Fop isolada do substrato da linhagem X10; C2- Pormenor de colónias de Fop isolada do substrato da linhagem X80...	49
Figura 3.7 - Sequência de nucleótidos do DNA amplificado da região ITS do fungo.....	50
Figura 3.8 - Plantas observadas 15 dias após inoculação das raízes de plantas da cv. “Oriente”, “Aintree”, “White Emergo” e linhagens X07, X09, X10, X15 e X08 e plantas Testemunha não inoculadas. Pormenor da distribuição aleatória dos tratamentos, na camara de crescimento.....	50
Figura 3.9 - Pormenor do desenvolvimento de plantas da cv. “Oriente”, “Aintree”, “White Emergo” e linhagens X07, X09, X10 e X15 X08 inoculadas com Fop e plantas Testemunha, observadas 21 dias após inoculação das raízes.....	51
3.10 – Comparação do crescimento de feijão rasteiro e feijão de trepar, 21 dias após inoculação das raízes utilizando a metodologia descrita por Pastor-Corrales e Abawi (1987), onde é evidente a diferença de crescimento das plantas.....	51

1- INTRODUÇÃO

1.1- A cultura do feijão-verde

1.1.1- Origem e história do feijão-verde

O feijoeiro teve origem na América Central, tendo ocorrido a sua especiação e domesticação provavelmente em três zonas distintas desta região: centro mesoamericano, sul-andino e norte-andino (Almeida, 2006).

A domesticação e posterior seleção da espécie levaram ao seu melhoramento, e promoção de características culturais desejáveis como ramificação reduzida, maior número de flores e vagens, sementes maiores, vagens indeiscentes e com lenhificação e fibrosidade reduzida. Esta seleção resultou também em genótipos indiferentes ao fotoperíodo (Almeida, 2006).

Após a descoberta do feijoeiro no continente americano, a introdução da cultura na Europa decorreu durante o século XVI, foi realizada pelos espanhóis em Sevilha e depois disseminado por toda a Europa e restantes continentes (Almeida, 2006). Para tal, muito contribuíram marinheiros e comerciantes, que trouxeram as coloridas e facilmente transportáveis sementes de feijão nos séculos XVI e XVII (Debouck, 1993).

Os primeiros exploradores europeus demonstraram um grande interesse no feijão e promoveram a sua difusão. De acordo com Mumba (1999), Gonzalo Fernández de Oviedo que explorou o Panamá e Nicarágua em 1530, incluiu nos seus relatórios de viagem informações detalhadas sobre técnicas de cultivo de feijão utilizadas pelos nativos americanos.

Os técnicos holandeses têm desempenhado uma ação de relevo no melhoramento do feijoeiro, dirigido sobretudo para a obtenção de variedades adaptáveis a diversas características do solo e com resistências a várias pragas e doenças. Desde o início da sua introdução na Europa, o feijão tem sido cultivado para fins alimentares com aproveitamento da vagem e da semente. Mais tarde, o feijoeiro foi utilizado como cultura arvense, com o objetivo de enriquecer o solo: sendo uma leguminosa, o feijoeiro forma associações na raiz com rizóbios, bactérias que fixam azoto atmosférico. O feijoeiro é ainda cultivado como componente da alimentação de gado (Ripado, 1992).

A grande expansão do feijoeiro dever-se-á ao seu valor alimentar, complementada pela grande diversidade de usos, fácil conservação e adaptabilidade a vários tipos de solo (Gardé e Gardé, 1988).

As espécies do género *Phaseolus* mais cultivadas são a *P. coccineus* L. (feijoca), *P. vulgaris* L. (feijão comum); *P. lunatus* L. (feijão fava ou manteiga); *P. multiflorus* L. (feijão escarlate) e *P. mungo* L. (feijão preto).

O cultivo do feijoeiro encontra-se localizado um pouco por todos os continentes, podendo dizer-se que é cultivado praticamente em todo o mundo (Voyset, 2000). O feijão é consumido como fonte de proteína por grande parte da população mundial, sendo especialmente importante onde o consumo de proteína animal é relativamente escasso (Pires *et al.*, 2005).

1.1.2 - Classificação Botânica

O feijão, designado cientificamente como *Phaseolus vulgaris* L., pertence à família Fabaceae (Quadro 1.1) (anteriormente designada por Leguminosae), que compreende aproximadamente 650 géneros e 18.000 espécies, distribuídas nas subfamílias Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae (Polhill *et al.*, 1981).

Atualmente, o género *Phaseolus* abrange 55 espécies, no entanto, apenas cinco são cultivadas. A espécie *P. vulgaris*, designada por feijão comum, é a mais difundida mundialmente e consumida em diversos países (Grisi, 2006).

Quadro 1.1 - Classificação botânica do feijão

Família	Fabaceae
Subfamília	Faboidea (sin. Papilionoideae)
Tribo	Phaseoleae
Género	<i>Phaseolus</i>
Espécie	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

Fonte: Almeida, 2006

1.1.3- Morfologia e estádios fenológicos da planta

O feijoeiro é uma planta anual e herbácea, podendo ser trepadeira ou rasteira, levemente pubescente, cujo ciclo de vida pode variar aproximadamente de 65 a 120 dias, dependendo da cultivar (ciclo curto ou ciclo longo) e das condições na época do cultivo (Maroto, 1989).

As cultivares de feijoeiro podem apresentar quatro tipos de hábito de crescimento, sendo um tipo determinado e os outros três indeterminados. O determinado caracteriza-se por o caule e os ramos laterais cessarem o crescimento e terminarem em flores, enquanto que o indeterminado apresenta crescimento contínuo e as flores são apenas laterais junto as folhas. O desenvolvimento do caule determina os principais tipos de planta: arbustivo, prostrado e trepador.

Os quatro tipos principais de hábitos de crescimentos são os seguintes:

- Tipo I – hábito de crescimento determinado, arbustivo e porte ereto.
- Tipo II – hábito de crescimento indeterminado, arbustivo, porte ereto e caule pouco ramificado.
- Tipo III – hábito de crescimento indeterminado, prostrado ou semi-prostrado, com ramificação bem desenvolvida e aberta.
- Tipo IV – hábito de crescimento indeterminado, trepador, caule com forte dominância apical e número reduzido de ramos laterais, pouco desenvolvidos (Vieira *et al.*, 2006).

De acordo com os mesmos autores, podem no entanto ocorrer padrões de crescimento intermediários entre os tipos indeterminados Tipo (II/III) e Tipo (III/IV).

As cultivares do tipo I são destinadas normalmente para a transformação industrial, as do tipo II e III são geralmente utilizadas para a produção de grão seco e as do tipo IV destinase normalmente a produção de feijão-verde (Almeida, 2006).

O sistema radicular do feijoeiro é aprumado, superficial e pouco extenso, desenvolvendo-se maioritariamente nos primeiros 30 centímetros do solo. Durante o crescimento existe uma raiz principal com numerosas raízes secundárias ramificadas, cujo crescimento pode ser facilmente interrompida por obstáculos existentes no solo.

O caule é levemente pubescente (revestido de leve penugem), delgado e frágil. As folhas, à exceção do par de folhas cotiledonares, são compostas, trifoliales e pecioladas (Almeida, 2006). Estas têm uma coloração verde com dimensões que variam de acordo com o teor de azoto presente no solo (Sprent e Minchin, 1985 citado por Campos, 2012).

As flores são perfeitas, isto é, hermafroditas, e nascem na axila das folhas, agrupadas em cachos determinados com 3 a 8 flores, compostas por um cálice com cinco sépalas e uma corola de cinco pétalas, de forma papilionácea. A pétala superior, maior que as restantes,

designa-se por estandarte, as duas pétalas laterais são as asas, e as duas inferiores soldadas entre si formam a carena ou quilha, que persiste na extremidade das vagens. O androceu possuiu dez estames filadelfos, dos quais nove se encontram concrescidos num tubo no interior do qual se situa o ovário monocarpelar e polispérmico com placentação auxiliar. A deiscência das anteras é longitudinal, diretamente sobre o estigma (Almeida, 2006).

A fecundação desta planta é maioritariamente autogâmica, verificando-se menos de 5% de alogamia, o que faz com que não se verifiquem grandes problemas no vingamento de frutos (Marques *et al*, s/d).

Os frutos (vagens) são, no geral, achatados, desenvolvendo-se longitudinalmente (13 cm a 25 cm na fase adulta), com cores de tonalidades distintas no decorrer da maturação. Nas vagens do género *Phaseolus* permanece um estilete que forma em apêndice na extremidade da vagem, o que distingue as vagens deste género das vagens do género *Vigna* (Almeida, 2006). A largura das vagens é variável (> 3cm) e estas contêm 3 a 7 sementes (Prolle, 2003).

Os feijões desenvolvem-se dentro das vagens, em número e forma variável, dependendo da variedade, podendo apresentar diversas formas (arredondada, elíptica ou reniforme), com tamanhos variáveis e uma ampla variabilidade de cores (branca, creme, vermelha, preta, rosa, roxa, alaranjada entre outras) (Prolle, 2003). A ausência de pigmentação nas sementes brancas é um carácter recessivo (Almeida, 2006).

As características agronómicas da semente são listadas no quadro seguinte (Quadro 1.2).

Quadro 1.2 – Características agronómicas da semente.

Número médio de sementes por grama	1-5
Peso médio de 1000 sementes (g)	200-1000 (média 200-350)
Pureza física mínima (% em massa)	98
Faculdade germinativa (%)	
Mínima	75
Cultivares comerciais	95
Duração da faculdade germinativa (anos)	3
Localização das reservas	Cotilédones
Tipo de germinação	Epígea

Fonte: Almeida, 2006.

Para uma maior segurança e precisão nas ações de intervenção na cultura do feijão, é recomendado o uso de uma escala (Quadro 1.3) baseada nas mudanças morfológicas da

planta, que estão correlacionadas a eventos fisiológicos, que se sucedem no ciclo dessa cultura, denominada escala fenológica (Dourado e Fancelli, 2000).

Quadro 1.3 – Escala fenológica do Feijão-verde.

Fase	Estádio	Descrição
V	V0	Emergência
V	V1	Cotilédones ao nível do solo
V	V2	Folhas primárias completamente expandidas
V	V3	1ª Folha trifoliada completamente expandida
V	V4	3ª Folha trifoliada completamente expandida
R	R5	Aparecimento dos primeiros botões florais
R	R6	Abertura da primeira flor
R	R7	Aparecimento das primeiras vagens cheias
R	R8	Primeiras vagens cheias
R	R9	Modificação da cor das vagens (ponto de maturidade fisiológica)

Fonte: Adaptado de Dourado e Fancelli (2000).

No processo de senescência o feijão-verde amarelece, fica fibroso e endurece. Igualmente a exposição ao etileno acelera estes sintomas de senescência e, deste modo, após a colheita, as vagens devem ficar separadas de frutos climatéricos, motores de combustão e outras fontes de etileno (Chitarra, 2005).

1.1.4- Preferências edafoclimáticas

O feijão é uma planta de climas temperados e, para conseguir a sua germinação em boas condições é necessário uma temperatura mínima de 14°C. O seu zero vegetativo situa-se entre os 8 e os 10°C, sendo uma planta muito sensível a geadas. Porém, temperaturas excessivamente altas também não lhe são favoráveis, principalmente quando aliadas a baixas humidades relativas do ar (Marques *et al*, s/d). Por vezes, temperaturas da ordem dos 30°C, associadas a teores de humidade baixos podem provocar a queda das flores e das próprias vagens recém-formadas. As vagens desenvolvidas nestas condições apresentam uma grande percentagem de grãos vazios, frutos com pouca turgidez e de pequena dimensão (Maroto, 1989). É uma planta que não aprecia as bruscas variações de temperatura, podendo um

arrefecimento brusco provocar enrolamento das vagens em formação. Esta situação é facilmente verificável nas culturas de inverno, normalmente nas plantas que se situam junto à entrada da estufa, mais sujeitas a variações de temperaturas (Marques *et al*, s/d).

A curvatura do feijão-verde, que diminui a sua qualidade, poderá dever-se aos seguintes fatores: ocorrência de temperatura baixa 10-13°C; descida rápida da temperatura no outono; luminosidade reduzida; ou temperaturas superiores a 30°C durante o verão (Almeida, 2006).

A estimativa de consumo hídrico do feijoeiro é de 300 a 500 mm, bem distribuídos ao longo do ciclo. A ocorrência de um déficit hídrico no solo pode prejudicar o desenvolvimento do feijoeiro, especialmente durante a floração (Doorenbos e Kassam, 1994).

A humidade relativa ideal situa-se entre 60 % e 75% ao longo do ciclo vegetativo da planta e, como regra, observa-se uma melhor tolerância à humidade nas fases iniciais do desenvolvimento (Ripado, 1992).

Embora não sendo uma planta exigente relativamente ao tipo de solo, o feijoeiro tem preferência por solos ligeiros, bem drenados e arejados. Uma boa drenagem interna é essencial para o êxito da cultura. O cultivo em solos com uma grande fração argilosa deve ser evitado, uma vez que a planta se adapta melhor aos solos ligeiros ou médios bem drenados.

Os valores de pH do solo estar compreendidos entre 5,5 e 7,0. Em solos muito alcalinos com pH superior a 7,5, as plantas têm problemas de enraizamento e podem apresentar cloroses, muitas das quais causadas por carências nutricionais de magnésio, manganês e zinco (Marques *et al*, s/d).

1.1.5- Doenças do Feijoeiro

O feijoeiro poderá sofrer o ataque de vários inimigos os quais, além de diminuir a produtividade da cultura, diminuem a qualidade do produto obtido.

Existem cerca de 60 doenças parasitárias do feijão, das quais cerca de 30 são provocadas por fungos, 18 por vírus, 5 por bactérias, 5 por nemátodes e 2 por fitoplasmas (Almeida, 2006). No quadro 1.4, e de acordo com a International seed Federation (ISF, 2114) referem-se os agentes patogénicos responsáveis por doenças no feijoeiro, indicando-se o nome da doença e o respetivo código (Recommended codes for Pest Organisms in Cereal and Vegetable Crops).

Quadro 1.4 – Principais doenças do feijoeiro.

Nome científico	Nome comum em Inglês	Código
Viroses		
<i>Bean common mosaic virus</i>	Bean common mosaic	BCMV
<i>Bean common mosaic necrosis virus</i>	Bean common mosaic necrosis	BCMNV
<i>Beet curly top virus</i>	Beet curly top	BCTV
<i>Bean golden mosaic virus</i>	Bean golden mosaic	BGMV
<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>	Bean golden yellow mosaic	BGYMV
<i>Beet mild curly top virus</i>	Mild curly top	BMCTV
<i>Beet severe curly top virus</i>	Severe curly top	BSCTV
<i>Bean yellow disorder virus</i>	Bean yellow disorder virus	BNYDV
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Bean yellow mosaic	BYMV
<i>Southern bean mosaic virus</i>	Bean southern virus	SBMV
<i>Cucumber mosaic virus</i>	Cucumber virus	CMV
Bactérias		
<i>Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola</i>	Halo blight	Psp
<i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i>	Bacterial brown spot	Pss
<i>Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli</i>	Common or fuscous blight	Xap
Fungos		
<i>Aphanomyces euteiches</i>	Root rot	Ae
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Anthraxnose	Cl
<i>Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli</i>	Fusarium wilt	Fop
<i>Fusarium solani f. sp. phaseoli</i>	Fusarium root rot	Fsp
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	White mold	Ss
<i>Uromyces appendiculatus</i>	Rust	Ua

Fonte: ISF, 2014.

Salienta-se ainda que para além dos patógenos referidos no quadro 1.4, os nemátodes-das-galhas-radiculares *Meloidogyne* spp. e os nemátodes-das-lesões-radiculares *Pratylenchus* spp. causam também doenças no feijoeiro.

1.1.6-Valor alimentar e composição nutricional

O feijão é um alimento de grande valor nutricional, com concentrações significativas de proteínas e minerais, pelo que o interesse da investigação direcionada para esta cultura tem aumentado a nível internacional, e desempenha um papel crucial na obtenção de dietas com qualidade nutricional. As suas vagens são consumidas principalmente em sopas e saladas. A semente seca do feijão é também um ingrediente comum em sopas, purés ou guisados, conservando-se durante bastante mais tempo, desde que adequadamente preparada e armazenada. Após secagem, a quantidade de água presente no feijão reduz-se em cerca de 13%, sendo o restante constituído por matéria seca onde predominam féculas e matérias azotadas. Para além de proteínas, possui um bom teor em hidratos de carbono, fibras minerais, vitaminas e um teor reduzido em lípidos (Quadro 1.5). Em contrapartida, possui diversos compostos anti-nutricionais como taninos, hemaglutininas, filato, inibidores de tripsina e de α -amilase, amidos não digeríveis e oligossacáridos da família da rafinose (OFR). Os OFR são compostos que estão na origem da flatulência causada pelo consumo de feijão, o que leva a muitas pessoas a deixarem de consumir este alimento (Almeida, 2006).

No quadro 1.5 são apresentados dados relativos à composição do feijão-verde (Almeida, 2006), incluindo macronutrientes, vitaminas, sais minerais e valor energético.

Quadro 1.5 – Composição média do feijão-verde e de feijão seco (grão). Valores expressos por 100g de parte comestível.

Nutrientes e Energia	Feijão		Vitaminas	Feijão		Minerais	Feijão	
	Verde	Seco		Verde	Seco		Verde	Seco
Água (%)	90	12	Vitamina A (IU)	690	0	Potássio (mg)	209	1006
Energia (Kcal)	31	333	Tiamina (mg)	0,084	0,529	Cálcio (mg)	37	143
Proteína (%)	1,8	23,6	Riboflavina (mg)	0,105	0,219	Fósforo (mg)	38	407
Gordura (%)	0,1	0,83	Niacina (mg)	0,752	2,06	Magnésio (mg)	25	140
Hidratos de carbono (%)	7,1	60	Ácido ascórbico (mg)	16,3	4,5	Sódio (mg)	6	24
Fibra (%)	3,4	24,9	Vitamina B6 (mg)	0,074	0,397	Ferro (mg)	1	8,2

Fonte: Almeida, 2006.

Em algumas regiões, a rama é aproveitada na alimentação dos animais domésticos sendo considerada, em muitos casos, como um bom substituto do feno de luzerna (Ripado, 1992).

1.1.7- Produção e comercialização do feijão-verde

A nível mundial são produzidos três tipos de feijão-verde que diferem na forma e na cor da vagem, nomeadamente as cultivares de vagem achatada ou plana, de cor verde e as cultivares de vagem redonda verde ou branca. Em Portugal as variedades mais utilizadas são as de vagem plana verde, embora seja também produzida em larga escala a cultivar regional de trepar, de vagem rajada, cujas produtividades são cerca de 50 a 75% inferiores às das cultivares híbridas, mas que em geral apresentam melhor aceitação no mercado nacional (Marques *et al*, s/d).

Os principais produtores mundiais são os países asiáticos, os europeus e os africanos, representando respetivamente 91,1%, 4,1% e 3,4% da produção mundial (GPP/MAM, 2014). A china e a Indonésia são os principais produtores mundiais, enquanto que a Itália, a Espanha, a Bélgica e a França são os principais produtores Europeus (GPP/MAM, 2014).

A nível nacional, a produção de feijão-verde dá-se um pouco por todo o país, tanto para autoconsumo quer para comércio. Ribatejo Oeste é a principal zona de produção, onde esta é a segunda cultura a ser produzida a seguir ao tomate (Almeida, 2006). Produz-se também no Algarve na Beira Litoral e no Entre Douro e Minho, em estufa e ao ar livre (Almeida, 2006).

De acordo com dados do INE (Quadro 1.6), a produção de feijão tem vindo a diminuir nos últimos anos, apesar de se verificar um aumento de produção em 2014, de 2012 a 2013 sofreu uma grande diminuição na produção, refletindo um grande défice de produção em relação à procura, sendo necessário importar. A Espanha é o nosso principal fornecedor e também o destino de grande parte da produção nacional.

Quadro 1.6 - Produção do Feijão-verde nos anos 2012 a 2014.

Ano	2012	2013	2014
Superfície (ha)	632	558	825
Produção (t)	12457	8593	13458

Fonte: INE, 2015.

1.2-A enxertia em horticultura

A enxertia em agricultura é uma prática centenária, sendo usada em muitos setores da agricultura, como viticultura, a fruticultura e em plantas ornamentais (Rodrigues, 2009).

Entende-se por enxertia, a união de duas partes de tecido vegetal vivo, de plantas diferentes, com o propósito de que formem união vascular, cresçam e se desenvolvam numa única planta. (Hartmann *et al.*, 1995). A técnica de enxertia herbácea iniciou-se no Japão, no início do século passado, como objetivo de prevenir a fusariose na cultura da melancia, enxertando a melancia sobre porta-enxerto de abóbora (*Cucurbita moschata*) (Lopes e Mendonça, 2014). Essa técnica espalhou-se de tal forma naquele país, que na década de 90, 95%, 60%, 62%, 30% e 10% da área ocupada com as culturas da melancia, do pepino, do melão, da beringela e do tomateiro, respetivamente, eram enxertadas (Peil, 2003).

Com o desenvolvimento de novas técnicas de enxertia e a utilização de porta-enxertos mais resistentes a doenças, a enxertia em horticultura foi introduzida com sucesso na Europa na década de 1990, acompanhada de um trabalho eficaz de marketing promovido pela indústria de sementes (Lopes e Mendonça, 2014).

A enxertia é uma ferramenta para o melhoramento genético do feijoeiro, e vários estudos têm sido realizados em relação à compatibilidade de porta-enxertos (Gurusami *et al.*, 2009).

Atualmente, a enxertia é uma técnica muito divulgada no nosso país, especialmente em cultura protegida. Os viveiristas de plantas hortícolas, instalados na zona Oeste, adotaram a técnica de enxertia nos últimos anos, com o objetivo de maximizar a produção e a qualidade das cultivares utilizadas (Teixeira, 2013).

O principal objetivo que se pretende alcançar com a enxertia de hortícolas é obter plantas resistentes ou tolerantes a doenças do solo e, portanto, possibilitar o cultivo de determinadas espécies em áreas contaminadas por patógenos. Enxerta-se a cultivar comercial sobre um porta-enxerto resistente, pertencente a outra cultivar, espécie ou género da mesma família botânica. Efetivamente não existe nenhum método capaz de prever o resultado de uma enxertia, porém, sabe-se que quanto maior a afinidade botânica entre as espécies, maior a probabilidade de o enxerto e o porta-enxerto serem compatíveis e portanto, de sobrevivência da planta enxertada (Peil, 2003). O conceito de compatibilidade é definida como a capacidade de duas plantas diferentes, unidas pela enxertia, convivem satisfatoriamente, como uma única planta (Gonzalez, 1999). Na maioria dos casos, a planta resultante do

processo de enxertia apresenta o sistema radicular do porta-enxerto e a parte aérea da cultivar. A formação da união do enxerto termina quando o ferimento cicatriza e quando se estabelece a circulação de água e nutrientes da raiz para a parte aérea e foto-assimilados da parte aérea para a raiz.

Esta técnica permite a obtenção de resistência a diversas doenças do solo, tais como, a podridão da raiz (*Pyrenochaeta lycopersici*), *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pseudomonas solanacearum*, *Verticillium albo-atrum* e nemátodes (Peil, 2003).

A enxertia é uma técnica alternativa a outros métodos de controlo de doenças como cultivares resistentes, desinfecção do solo, uso de fungicidas, rotação de culturas e que não contamina o meio ambiente (Piel, 2003).

A utilização desta técnica no controlo dos patógenos de origem edáfica demonstra-se bastante favorável quando comparada com outras técnicas, como por exemplo a solarização do solo, a desinfecção por vapor de água e até mesmo a pulverização com produtos químicos (Brandão *et al*, 2003).

1.2.1-Propriedades de um Porta-Enxerto

A escolha do porta-enxerto é importante para se conseguir um bom resultado a nível da produção. Em geral, um porta-enxerto deve reunir as seguintes características: resistência ou tolerância à doença que se pretende controlar; boa resistência a outros patógenos do solo; vigor e rusticidade; boa afinidade com a cultivar enxertada; condições morfológicas ótimas para a realização da enxertia (tamanho e consistência do hipocótilo) e, não afetar desfavoravelmente a qualidade dos frutos (Peil, 2003). A qualidade do porta-enxerto, nomeadamente a robustez e vigor, é determinante para que a planta enxertada evidencie também boas características produtivas.

Os métodos utilizados para a enxertia de culturas hortícolas são vários, incluindo métodos tradicionais, e métodos mais sofisticados que utilizam máquinas e robôs.

1.2.2-Potencialidades e constrangimentos da enxertia

Existem diversas vantagens da utilização da técnica de enxertia na produção agrícola. Segundo Rodrigues (2009) os benefícios da enxertia devem-se ao fato de simultaneamente se obter uma produção segura para o consumidor e para o ambiente, diminuindo a necessidade de utilização de pesticidas e fertilizantes. Este autor refere que a técnica de

enxertia aumenta: a capacidade de absorção de nutrientes, a resistência a doenças do solo como *Fusarium*, *Verticilium*, “*Corky-Root*”, a resistência a nemátodes e a qualidade e quantidade dos frutos sem afetar a tipologia dos mesmos. Cita também que há um aumento da tolerância a altas e baixas temperaturas, à salinidade, a solos demasiados húmidos e que ocorre um crescimento rápido e vigoroso da planta. O quadro 1.7 apresenta os diferentes objetivos da enxertia nas culturas de pepino, melancia, melão, tomate e beringela.

Quadro 1.7 - Objetivos da enxertia nas culturas de pepino, melancia, melão, tomate e beringela.

Culturas	Objetivos
Pepino	Brilho nos frutos, controle de <i>Fusarium</i> sp., tolerância a baixas temperaturas, vigor e controle de <i>Phytophthora melonis</i> .
Melancia	Controle de <i>Fusarium oxysporum</i> , tolerância a baixas temperaturas, desequilíbrios fisiológicos, tolerância a seca.
Melão	Controle de <i>Fusarium oxysporum</i> , tolerância a baixas temperaturas, desequilíbrios fisiológicos, controle de <i>Phytophthora</i> spp.
Tomate	Controle de <i>Ralstonia Solanacearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Pyrenochaeta lycopersici</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Verticillium dahliae</i> .
Beringela	Controle de <i>R. solanacearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>V. dahliae</i> , tolerância a baixas temperaturas, nemátodes e vigor.

Fonte: ODA, 1995.

O aumento do vigor da planta pelo porta-enxerto, permite diminuir a aplicação de fertilizantes, visto que pelo seu desenvolvimento radicular, possibilita uma melhor absorção de água e nutrientes. Como exemplo refere-se o caso da melancia, em que normalmente é recomendada a diminuição de metade a dois terços de fertilizante a aplicar, em relação ao que se recomenda em plantas não enxertadas (Lee *et al.*, 2010). O mesmo acontece com os fungicidas, podendo reduzir-se ou mesmo excluir-se a sua aplicação, o que é muito vantajoso para o Modo de Produção Biológico (MPB). A enxertia em plantas hortícolas tem sido adaptada com segurança ao MPB, pois caracteriza-se por ser uma técnica que protege o ambiente, minimizando os resíduos tóxicos indesejáveis, sendo uma forma de responder à crescente procura por alimentos saudáveis produzidos de forma sustentável (Lee *et al.*, 2010).

Para que a planta enxertada tenha sucesso, são vários os fatores a ter em conta durante e após o processo de enxertia. Segundo Rodrigues (2009), alguns dos fatores que influenciam o sucesso deste processo são:

- Temperatura - é necessário manter a temperatura entre 24°C e 27°C após o enxerto e durante cerca de 6 a 8 dias. Abaixo dessa temperatura, a ligação é muito lenta ou inexistente, não se ocorrendo abaixo de 15°C.
- Humidade - após a realização da enxertia a humidade relativa do ar deve ser mantida aproximadamente a 100%, de forma a evitar desidratações. A planta nunca deve apresentar murchidão.
- Oxigénio – durante o processo de divisão e crescimento das células existe um aumento da respiração das plantas, pelo que é necessária a presença de oxigénio na união do enxerto, de forma a facilitar a formação de tecido de calo.
- Técnica de enxertia – o tipo de enxertia varia de acordo com a espécie a enxertar, devendo ser escolhido a técnica e o porta enxerto adequado. A superfície de contato entre o porta-enxerto e a cultivar a enxertar deve ser a maior possível, de forma a suportar a maior troca possível de água e seiva entre elas.
- Contaminação – um dos principais problemas que pode levar ao insucesso da enxertia é a contaminação por bactérias ou fungos durante o processo de corte das plantas, devendo, por isso, haver um cuidado muito elevado nas condições de limpeza, higiene e desinfeção dos locais, ferramentas e das pessoas intervenientes em todo o processo de enxertia.
- Condições ambientais – após a enxertia as condições ambientais devem ser as adequadas para suportar a vida das plantas, durante um processo que é crítico, após o corte das plantas, devendo ser mantidas condições de humidade, temperatura e iluminação devidamente controladas (Rodrigues, 2009).

Uma das grandes limitações desta técnica é o baixo nível de compatibilidade entre as plantas a enxertar (Santos, 2005), que além de poder estar relacionada com a biologia e fisiologia do enxerto e porta-enxerto, pode resultar de vários fatores como: condições ambientais, ataque de pragas e doenças e alterações nutricionais (Andrews e Marques, 1994).

A baixa compatibilidade entre as plantas tem como consequência a rutura no local da enxertia e o insucesso da técnica. Alguns indicadores da baixa compatibilidade referidos por vários autores (Fachinello *et al.*, 1995) são:

- Falta de união entre o enxerto e o porta-enxerto como resultando da diferença entre os diâmetros das duas plantas;
- Desenvolvimento excessivo abaixo, acima ou no ponto de união;

- Amarelecimento das folhas e queda precoce;
- Crescimento vegetativo reduzido do porta-enxerto ou da cultivar a enxertar;
- Produção de frutos pequenos ou de má qualidade;
- Morte prematura da planta.

A incompatibilidade entre plantas constitui portanto, o insucesso desta técnica. Para diminuir o risco de incompatibilidade é importante realizarem-se estudos de compatibilidade, considerando as características das plantas, os objetivos da enxertia e as condições ambientais e geográficas do local onde as plantas vão ser utilizadas para produção.

Para concluir, refere-se que apesar de existirem custos adicionais desta técnica no preço final das plantas enxertadas, a enxertia utilizada em culturas hortícolas apresenta vantagens, sendo estes custos compensados ou mesmo anulados pela diminuição da utilização de fertilizantes e pesticidas e aumento de produção, devido à menor incidência de doenças.

1.2.3- Enxertia de culturas hortícolas em Portugal

Em Portugal, as empresas de produção de plantas realizaram os primeiros ensaios de enxertia em 1999 com a cultura do tomateiro, e mais tarde em 2002 com a melancia e pepino. Desde 2007, data em que se iniciou a produção de tomate utilizando plantas enxertadas, a procura de plantas enxertadas para produção em estufa tem aumentado significativamente (Mourão, 2014). Em 2009 a empresa Aromas e Flores comercializou em Portugal e Espanha cerca de 700 mil plantas enxertadas de melancia, equivalente a 280 hectares de produção (FLF, 2010). A utilização desta técnica noutras espécies como o pepino, pimento, melão e feijão-verde, tem aumentado significativamente em Portugal (Mourão, 2014).

A investigação no desenvolvimento de porta-enxertos tem incidido principalmente na procura de resistência a doenças tais como a suberose radicular (*Pyrenochaeta lycopersici*), fusariose (*Fusarium oxysporum*) e ainda a nemátodes *Meloidogyne* spp. (Mourão, 2014). Neste momento, a técnica de enxertia em feijão-verde ainda é recente e pouco conhecida em relação à enxertia do tomate e da melancia, sendo Portugal, e especificamente a empresa Aromas & Flores, pioneiro europeu em enxertia de feijoeiro. De forma a melhorar esta técnica têm sido realizados diversos estudos, tendo-se concentrado em porta enxertos resistentes a pragas e doenças que afetam a cultura do feijão-verde, como o *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Cichy *et al.*, 2007).

1.3- Nemátodes-das-galhas-radiculares *Meloidogyne* spp.

Os nemátodes são animais tipicamente vermiformes, não segmentados e presentes em todos os sistemas em que ocorra decomposição, sendo um grupo muito diverso, quer em riqueza de espécies, quer funcionalmente. No solo, não só são os animais mais abundantes, como também se encontram em todos os níveis tróficos consumidores, intervindo em processos-chave de decomposição e mineralização de nutrientes (Costa *et al.*, 2011). Embora a maioria dos nemátodes do solo sejam organismos de vida livre, alimentando-se de algas, bactérias, fungos, outros nemátodes e protozoários, outros são parasitas de animais ou de plantas (Yeates *et al.*, 1993). São organismos microscópicos, não ultrapassando geralmente 1 mm de comprimento, e de corpo transparente, não sendo visíveis a olho nu. O seu deslocamento no solo é limitado, geralmente não ultrapassando alguns centímetros. A sua distribuição é então fortemente agregada e a sua disseminação, portanto, é altamente dependente do Homem, por meio da introdução de plântulas infetadas, deslocamento de equipamentos de áreas contaminadas para áreas não contaminadas e pelos sistemas de irrigação (Santin, 2008).

Os nemátodes fitoparasitas podem ser ectoparasitas, vivendo fora do hospedeiro e alimentando-se a partir do exterior da raiz, ou endoparasitas, vivendo parte do seu ciclo de vida dentro das raízes da planta hospedeira. Os nemátodes endoparasitas podem, além disso, manter a mobilidade dentro da raiz, sendo designados por migratórios (por exemplo *Pratylenchus* spp.) ou estabelecer locais de alimentação em que se fixam e desenvolvem, sendo designados por sedentários (Williamson e Hussey, 1996).

Os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR), *Meloidogyne* spp., são nemátodes endoparasitas sedentários de grande importância económica, parasitando praticamente todas as plantas vasculares, estando amplamente distribuídos tanto em regiões de clima quente e tropical como em regiões de clima temperado. Estes nemátodes fitoparasitas causam anualmente um prejuízo de milhares de milhões de euros, não só pela redução da quantidade mas também da qualidade de produtos agrícolas, e por predisporer as plantas ao ataque de outros agentes patogénicos, como fungos e bactérias, que atacam a planta como agentes patogénicos secundários. Em países em desenvolvimento, com poucos recursos para despende em pesticidas sintéticos e com baixa capacidade de análise laboratorial, o cultivo chega a ser abandonado em campos altamente infestados por NGR (Nicol *et al.*, 2011). Entre os nemátodes fitoparasitas, os NGR são os que mais danos económicos causam, tendo

recentemente sido classificados como número um na lista dos dez nemátodes fitoparasitas mais importantes para a comunidade de nematologistas mundial (Jones *et al.*, 2013). Uma pesquisa a nível mundial de NGR em solos agrícolas (realizado nos anos 1980 no âmbito do Projeto Internacional de *Meloidogyne*) demonstrou a existência generalizada de quatro espécies de *Meloidogyne*: *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* e *M. javanica* (Hadisoeganda, 1982), sendo estas então consideradas as principais espécies do género que atacam as culturas. No entanto, o género tem atualmente cerca de 100 espécies descritas (Castagnone-Sereno e Danchin, 2014). Em sistemas agrícolas, os NGR têm elevado impacto, reduzindo a produção, especialmente de hortícolas, através da alteração da conformação e da fisiologia da raiz, interferindo com a absorção de água e nutrientes.

1.3.1-Ciclo de Vida

As espécies do género *Meloidogyne* caracterizam-se por um acentuado dimorfismo sexual: a fêmea apresenta forma globosa, piriforme ou em forma de saco, e é imóvel, alimentando-se em locais de alimentação fixos na raiz; o macho tem corpo vermiforme e não se alimenta, abandonando a raiz quando atinge o estágio adulto. Cada fêmea pode por até 500 a 1000 ovos numa massa gelatinosa exposta na superfície da raiz (Marques *et al.*, s/d, Costa *et al.*, 2000). Após os estádios de desenvolvimento pré-embrionário, o jovem de primeiro estágio (J1) sofre uma muda ainda dentro do ovo, tornando-se o jovem de segundo estágio (J2), sendo esta a forma que eclode do ovo e corresponde ao estágio infectivo do nemátode (Figura 1.1).



Figura 1.1 - Jovens de segundo estágio de nemátodes das galhas radiculares *Meloidogyne javanica* (ampliação de 40 x) (Costa, 2014).

Após a eclosão, o J2 move-se no solo até encontrar a raiz de uma planta suscetível. A penetração dá-se na zona meristemática, perto da ponta da raiz. O nemátode move-se intercelularmente até estabelecer um local de alimentação no cilindro vascular da raiz, com correspondente indução da formação de células gigantes. A multiplicação e expansão celular na zona do local de alimentação forma a estrutura de galha radicular, típica da infecção por estes nemátodes, e cujas células gigantes atuam como sumidouro de nutrientes da planta, alimentando o nemátode. Estabelecido o local de alimentação, o J2, sexualmente indiferenciado, continua o seu desenvolvimento, sofrendo mais três mudas até atingir a fase adulta de macho ou fêmea (Ferraz, 2001) (Figura 1.2). Posteriormente, os machos adultos abandonam o sistema radicular e as fêmeas permanecem no interior das raízes, como endoparasitas sedentários até ao final do ciclo de vida (Tihohod, 2000).

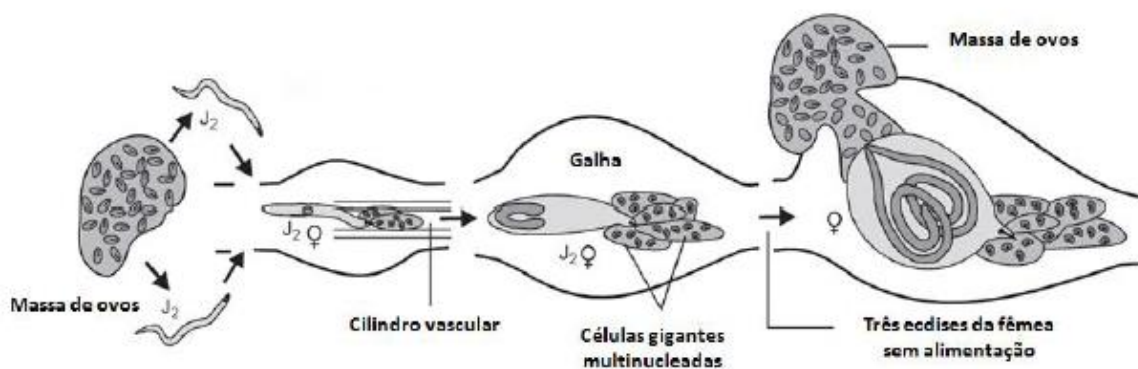


Figura 1.2- Representação do ciclo de vida *Meloidogyne* spp (Adaptado de Jung e Wyss, 1999 citado por Bruinsma, 2013).

Para que ocorra o parasitismo pelos nemátodes, são então consideradas diversas etapas de iniciais de interação planta-nemátode: i) atração do J2 pela planta pelo reconhecimento de fitoquímicos nos exsudatos radiculares, ii) penetração do J2 pela região meristemática da raiz, sem ser reconhecido ou ter o seu movimento restringido pela planta; iii) movimentação dentro do hospedeiro para identificação do local de alimentação, iv) injeção da saliva do nemátode nas células da planta, contendo elicitores da glândula esofágica dorsal; v) reconhecimento dos *elicitors* pela planta, que responde com a formação das células gigantes. Portanto, o sucesso do parasitismo do J2 em plantas envolve o cumprimento de todas estas etapas, o que requer uma interação parasita-hospedeiro perfeita (Rocha, 2007). Qualquer falha numa destas etapas poderá comprometer o sucesso desta interação, sendo então a planta considerada não-hospedeira, ou resistente (Taylor e Sasser, 1978).

As diferentes espécies de NGR podem reproduzir-se por fertilização cruzada ou por partenogénese meiótica (facultativa) ou mitótica (obrigatória). As espécies tropicais, de distribuição mundial e grande sucesso evolutivo, reproduzem-se frequentemente por partenogénese mitótica, gerando populações clonais de elevada densidade em curtos períodos de tempo, num hospedeiro suscetível e em condições favoráveis (Trudgill e Blok, 2001, Castagone-Sereno e Danchin, 2014).

Além de serem parasitas obrigatórios, o ciclo de vida dos NGR depende de alguns fatores abióticos, sendo o mais importante a temperatura. O ciclo e vida de *M. javanica* dura aproximadamente quatro semanas a uma temperatura média de 25°C, mas podendo prolongar-se sob condições de temperatura desfavoráveis. Temperaturas inferiores a 20°C ou superiores a 35°C afetam o desenvolvimento tornando o ciclo mais longo e podendo pôr em causa a sobrevivência do nemátode (Costa *et al.*, 2000).

1.3.2- Sintomas

As plantas infetadas por NGR não desenvolvem sintomas específicos na parte aérea, o que dificulta a correta identificação do problema por parte dos produtores. Alguns dos sintomas das plantas infetadas com nemátodes são: zonas sem plantas ou com plantas pouco desenvolvidas no meio de plantas vigorosas numa plantação; murchidão de plantas que se mantém mesmo depois de serem regadas à noite; cloroses nas folhas; galhas radiculares, em números e tamanhos variados, dependendo da suscetibilidade, da cultivar e da densidade populacional do nemátode (Embrapa, 2010; Marques *et al* s/d). À exceção deste último sintoma, apenas facilmente diagnosticável após a infeção e quando as plantas são muito suscetíveis, formando galhas claramente visíveis, os sintomas são gerais e indicativos da falência radicular, uma vez que os NGR interferem com a capacidade de absorção de água e nutrientes. A formação de células gigantes, como resultado da infeção por NGR, provoca uma interrupção e desorganização do sistema vascular. Consequentemente há uma diminuição na absorção e no transporte de água e nutrientes, influenciando diretamente a produtividade (Cofcewicz *et al.*, 2001) por consequência da infestação severa de nemátodes, o sistema radicular pode ser ainda facilmente colonizado por bactérias e fungos, o que provoca o seu apodrecimento, fazendo com que as plantas não absorvam água e nutrientes do solo de forma adequada (Santin, 2008).

1.3.3-Meios de proteção

Embora não possuam mecanismos de resistência como a criptobiose, os NGR passam quase todo o seu ciclo de vida dentro da raiz da planta hospedeira, e o seu estágio infectivo, que se encontra no solo, é uma forma de resistência (Bird e Opperman, 1998), capaz de sobreviver a condições adversas e por longos períodos. Em várias espécies de NGR, a rápida multiplicação por partenogénese, aliada à polifagia (Castagnone-Sereno e Danchin, 2014) que lhes permite manterem as populações em plantas espontâneas na ausência de uma cultura suscetível, vem dificultar ainda mais a sua erradicação. Assim, várias medidas de controlo devem ser utilizadas de modo integrado, visando manter as populações em nível mínimo.

Para uma gestão planeada e sistematizada de nemátodes, propõe-se a proteção integrada, considerando-se os princípios fitopatológicos de Whetzel: a) Exclusão: evitar a infestação de áreas sãs por NGR, na propriedade ou numa região geográfica maior, ou seja, evitar a introdução e a disseminação; b) Erradicação: rotação de culturas com espécies de verão de inverno não hospedeiras e/ou antagonistas, tendo como objetivo a redução da densidade populacional do nemátode; c) Regulação: modificação do ambiente de nutrição das plantas; d) Imunização: utilização de cultivares resistentes aos nemátodes; e) Terapia) visa restabelecer a sanidade de uma planta após infeção pelo nemátode (Torres *et al*, 2009 citado por Bruinsma, 2013).

A aplicação destas medidas deve-se iniciar durante a produção das plantas nos viveiros, isto porque as espécies de NGR podem ser disseminadas através do material vegetal, como bolbos, cormos ou raízes, sendo necessário recorrer a material vegetal com certificação fitossanitária, produzido em solo sem existência de nemátodes. A disseminação dos NGR entre diferentes parcelas pode ocorrer através da circulação de maquinaria e veículos agrícolas que tenham estado em contacto com o solo e material infetado, pelo que deve ser realizada a sua limpeza após a utilização (Moens, 2006). A destruição de raízes e plantas infetadas podem também reduzir a densidade populacional dos NGR (Widmer, 2002).

A gestão e controlo do NGR podem ser realizados através de medidas de controlo químico, biológico ou cultural.

No século passado, o método mais eficaz de eliminação dos nemátodes fitoparasitas em sistemas agrícolas era a aplicação de brometo de metilo, que pela sua elevada toxicidade funcionava como biocida, matando não só os nemátodes fitoparasitas, mas também os nemátodes de vida livre, que pelo seu envolvimento nas cadeias de decomposição têm um

papel benéfico no sistema-solo, e ainda outros organismos edáficos. Pelos perigos inerentes à sua aplicação e efeitos nocivos sobre o ambiente, foi banido na Europa, o que tem estimulado a investigação sobre meios alternativos de controlo de nemátodes fitoparasitas. Embora ainda sejam correntemente aplicados outros nematodocidas fumigantes ou em granulado, estes têm também elevada toxicidade a organismos não-alvo, prevendo-se que sejam também eles banidos num futuro próximo (Nicol *et al.*, 2011; Costa, 2014).

Em termos de controlo biológico, têm sido desenvolvidos agentes de controlo constituídos por fungos ou bactérias contra NGR, mas com sucesso moderado. Os agentes de controlo biológico já em desenvolvimento e sob investigação, como a bactéria *Pasteuria penetrans* ou o fungo *Pochonia chlamydosporia*, têm sido apontados como responsáveis pela redução das populações de NGR em solos naturalmente supressivos ou mesmo em sistemas naturais (Costa *et al.*, 2012).

A rotação ou consociação de culturas fazendo uso de cultivares resistentes a NGR, acompanhada por solarização e biofumigação, é ainda uma prática cultural com algum sucesso. A utilização de cultivares resistentes ou tolerantes é uma ferramenta muito importante no controlo deste nemátodes (Ferraz, 2001), mas dificilmente estarão disponíveis cultivares que aliem uma produção desejável em termos de qualidade e de quantidade com a resistência a NGR. O desenvolvimento de porta enxertos com resistência/tolerância a NGR assume-se como uma estratégia de interesse para a proteção das culturas que poderá permitir ultrapassar os danos causados por estes agentes patogénicos de forma sustentável (Costa, 2015).

1.4- Fusariose vascular do feijoeiro

Fusarium oxysporum é a espécie mais importante do género *Fusarium* (Neergard, 1979). É uma espécie com considerável variação morfológica e fisiológica, sendo capaz de crescer saprofiticamente ou infetar mais de 100 hospedeiros diferentes, que incluem culturas importantes em todo o mundo, como o algodoeiro, a bananeira e várias hortícolas (Michielse e Rep, 2009), causando doenças caracterizadas pela murchidão e morte das plantas. No feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), a murchidão vascular é causada por *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick and Sydneys (Fop).

Fop infeta algumas espécies do género *Phaseolus*, principalmente *Phaseolus vulgaris* e *P. coccineus* (de Vega-Bartol *et al.*, 2011). Uma vez introduzido no campo é difícil de controlar,

e pode persistir no solo durante muitos anos sob a forma de estruturas de resistência, clamidósporos, ou saprofiticamente (Mohan *et al.*, 1983). Apesar de muitas espécies de *Fusarium* apresentarem a capacidade de penetrar no tecido cortical das raízes, apenas as *formae speciales* do fungo têm capacidade de invadir os tecidos vasculares através do crescimento do micélio ou da formação de microconídios, transportados na seiva do hospedeiro (Di Pietro *et al.*, 2003). Sendo um fungo habitante do solo infeta as plantas hospedeiras através das raízes, sendo muito difícil de controlar, e por esta razão, a procura e utilização de cultivares resistentes, que possam também ser usadas como porta enxertos, é apontada como uma das estratégias de proteção mais eficazes contra esta doença.

1.4.2- Sintomas

O fungo, descrito pela primeira vez no Vale do Sacramento, Califórnia (EUA) em 1929, por Harter (Pereira, 2007), limita a produção de feijão seco em todo o mundo (Niño-Sánchez *et al.*, 2015), originando perdas económicas por vezes superiores a 30% (Abawi e Pastor, 1990). Os sintomas típicos da doença caracterizam-se pelo amarelecimento longitudinal dos caules, paragem do crescimento, murchidão da planta, amarelecimento e senescência prematura das folhas e severa desfoliação. A presença do fungo nos vasos xilémicos leva à murchidão da planta, sintoma típico da doença. Frequentemente a maturação das vagens ocorre mais rapidamente, as sementes ficam com menor tamanho, há diminuição da produção e a planta acaba por morrer (Ronquillo-Lopez *et al.*, 2010).

Quando a doença infeta plantas jovens, assiste-se à redução do desenvolvimento e nanismo das plantas, podendo levar à seca e posteriormente à morte da planta. O interior dos tecidos vasculares adquire coloração avermelhada ou violeta característica e, com humidade elevada, desenvolvem-se externamente nos caules da planta, estruturas do fungo (micélio e conídios) com coloração rosada (Bianchini *et al.*, 1997).

Os sintomas causados por *Fusarium* são agravados pela presença de nemátodes dos géneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus* e *Rotylenchulus*, que aumentam a severidade da doença por enfraquecerem a planta e provocarem feridas nas raízes, facilitando a penetração do patógeno no seu sistema radicular (Coutinho e Suassuna, 2007 citado por Santin, 2008).

1.4.3- Caraterísticas culturais e morfológicas

As colônias apresentam-se pouco coloridas inicialmente, mas que com a idade adquirem um tom de aspeto pálido e, sob determinadas condições, adquire coloração purpúrea. O micélio aéreo branco é septado. Nesta espécie são produzidos três tipos de esporos: microconídios, macroconídios e clamidósporos. Os microconídios são abundantes, nunca em cadeias e maioritariamente não septados apresentam formas variáveis, como ovais ou cilíndrico-elipsoidais, retos ou curvos (Figura 1.3), e medem de 5 a 12 μ de comprimento e 2,2 a 3,5 μ de largura (Booth, 1971). Os conidióforos são curtos, posteriormente organizados em *clusters* densamente ramificados. Os macroconídios são fusiformes, ligeiramente curvados e pontiagudos nas duas extremidades (Figura 1.4). Os macroconídios com três septos são os mais comuns e têm de 27 a 46 μ de comprimento e de 3,0 a 4,5 μ de largura (Booth, 1971). Os clamidósporos com paredes lisas ou rugosas são terminais ou intercalares, geralmente solitários mas, ocasionalmente, em pares ou cadeias (Booth, 1971).

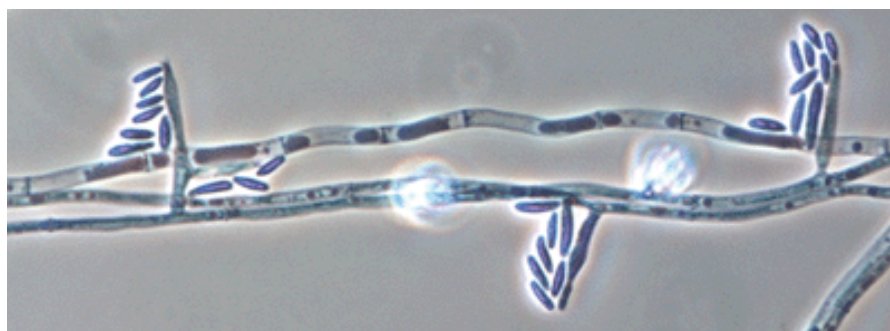


Figura 1.3- Microconídios de *F. oxysporum* (Ellis, 2015).



Figura 1.4- Macroconídios de *F. oxysporum* (Ellis, 2015).

1.4.3- Epidemiologia

Fusarium oxysporum é um fungo cosmopolita com múltiplas formas especializadas, cujo ciclo de vida inclui uma etapa de crescimento saprófito e uma de crescimento parasitário, com fases diferentes em cada uma.

O inóculo primário de *Fusarium oxysporum*, normalmente encontra-se no solo ou na semente em forma de clamidósporos, que germinam por ação dos exsudados liberados pelas raízes das plantas. Ao germinar, os clamidósporos podem penetrar na zona de emergência das raízes secundárias ou através de feridas provocadas pelo crescimento (início da fase parasitaria) (Lugo, 2008). No entanto, o que determina o sucesso ou não da penetração do hospedeiro e o desenvolvimento do fungo é o balanço entre os mecanismos de resistência do hospedeiro e os mecanismos de infecção do fungo (Toyoda *et al*, 1988). Após penetração no tecido saudável, o fungo começa a invadir o hospedeiro, desenvolvendo-se pelo córtex e dirigindo-se para o sistema vascular. Já estabelecido nesta área, o fungo produz microconídios, que invadem o xilema usando o fluxo ascendente da água para a parte apical da planta, formando novos pontos de infecção (Beckman, 1987). Com a evolução da colonização, ocorre o bloqueio dos vasos infetados, limitando parcial ou totalmente a passagem de água e de elementos minerais para a parte aérea da planta (Silva, 2012). O progresso da doença é paralisado em cultivares resistentes, provavelmente devido a alterações químicas ou estruturais do tecido do hospedeiro (Mace *et al.*, 1981). Entre estas, incluem-se a obstrução vascular por tiloses, deposição de camadas adicionais nas paredes dos vasos e infusão com compostos fenólicos e outros metabólicos (Mace *et al.*, 1981). Nos estádios finais de desenvolvimento da doença, o patógeno cresce para as células do tecido cortical produzindo um grande número de clamidósporos. O fungo pode, também, emergir na superfície do tecido infetado, produzindo, além dos conídios, um abundante micélio de cor rosada (Abawi, 1989).

Quando a humidade é elevada, este fungo começa a multiplicar-se formando uma grande quantidade de conídios sobre as lesões das hastes infetadas, além do micélio, que é espalhado por todo o tecido infetado formando-se clamidósporos, e dando início à fase saprófita (Lugo, 2008).

Este fungo, sobrevive nos restos das culturas no solo na forma de micélio ou na forma de clamidósporos durante vários anos (Alexopoulos *et al*, 1996). A disseminação pode ocorrer por meio de sementes contaminadas, fragmentos infetados do tecido do hospedeiro, pelo

vento, água de rega e maquinaria, que transportam partículas de solo infetados e ainda pela ação do homem (Pereira, 2007).

1.4.4- Meios de proteção

O controlo da fusariose vascular pode ser efetuado através de práticas culturais, utilização de fungicidas e resistência genética do hospedeiro. Uma das práticas culturais mais importantes no controlo da doença consiste em impedir a introdução do patógeno em áreas não infetadas. Esta prevenção pode ser obtida evitando a introdução de resíduos de cultura infetados, sementes infetadas, água de irrigação contaminada e equipamentos com partículas do solo infetadas (Abawi, 1989).

Outra forma de controlo, em áreas isentas de contaminações, é o uso de sementes sãs e ou/ tratadas quimicamente (Ito, 2004). O controlo químico deve ser direcionado para o tratamento da semente, o qual pode ser útil, também, para o controlo de outros patógenos. Este tratamento tem a função de desinfetar a semente e de proteger a plântula no seu estágio inicial de desenvolvimento.

Nos solos ácidos, a correção do solo através da calagem e uma adubação equilibrada tem reduzido os danos causados por este patógeno. A calagem eleva o pH do solo e otimiza a utilização de nutrientes pelas plantas, além de estimular o desenvolvimento de microrganismos antagonistas do fungo (Bianchini *et al.*, 1997). A utilização de solos bem drenados e uma boa fertilização promovem um bom desenvolvimento das plantas, contribuindo para que estas sofram menos com a doença. A rotação de culturas, principalmente com gramíneas é recomendável por longos períodos (Abawi, 1989).

A solarização do solo é uma técnica com efeitos positivos na redução de populações de *Fusarium* no solo (Moura, 1993) sendo referida como um meio de luta com sucesso no controlo de Fop (Ghini *et al.*, 2003). Em conjunto com a biofumigação e combinada com a rotação de culturas e práticas culturais adequadas à manutenção de baixos níveis populacionais de Fop no solo, esta técnica pode ser de grande interesse quando combinada ainda com a utilização de cultivares ou porta enxertos que apresentem baixa ou moderada resistência a este patógeno.

O controlo biológico utilizando isolados de *Trichoderma* spp. (*T. viridae* e *T. aureoviridae*), que são referidos na bibliografia com resultados favoráveis no controle desta doença do feijoeiro (Reis, 1995) apresentam-se como mais uma alternativa no controlo de Fop.

A erradicação de um patógeno estabelecido na área e que sobrevive no solo é praticamente impossível, além de não ser economicamente viável (Abawi, 1989). Apesar da fusariose vascular do feijoeiro poder em certa medida ser controlada pelos métodos referidos anteriormente, nas áreas contaminadas, o uso de variedades resistentes ou tolerantes é a forma mais eficaz de controlar a doença (Bianchini *et al.*, 1997).

1.5-Objetivos do trabalho

Este trabalho, inserido no mestrado de Agricultura Biológica, realizado na Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, teve como principal objetivo avaliar a resistência/tolerância de linhagens de Feijoeiro ao nemátode *Meloidogyne javanica* e ao fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, pretendendo identificar algum potencial de resistência a estes organismos fitopatogénicos que pode ser explorado no desenvolvimento de porta-enxertos de feijoeiro. Foram então considerados os seguintes objetivos específicos: avaliar a reprodução e os danos causados a linhagens de feijoeiro por *Meloidogyne javanica* em ensaios em condições controladas; avaliar o desenvolvimento de sintomas e a colonização interna de caules de linhagens de feijoeiro infetados com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*; validação de metodologias padrão de análise da resistência a *F. o.* f.sp. *phaseoli*, em condições controladas.

Este estudo enquadra-se, ainda, no âmbito do projeto COST Action FA 1204 – Vegetable Grafting to Improve Yield and Fruit Quality under Biotic and Abiotic Stress Conditions, com a parceria da Escola Superior Agrária de Ponte de Lima (ESAPL) - IPVC.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 -Localização e preparação dos ensaios

Os ensaios foram realizados em vasos numa câmara de crescimento da Escola Superior Agrária de Ponte de Lima do Instituto Politécnico de Viana do Castelo. Os ensaios decorreram numa câmara de crescimento em condições controladas de temperatura (20-25°C) e iluminação (fotoperíodo 16/8h). O ensaio de avaliação da resistência de linhagens de feijoeiro ao nemátode *Meloidogyne javanica* decorreu no período de 18 de março (inoculação do nemátode) a 18 de maio de 2015. O ensaio de avaliação da resistência de linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* decorreu no período 3 de julho (inoculação do Fop) a 12 de agosto de 2015. Antes de se proceder ao ensaio, todo o material utilizado (vasos e camara de crescimento) foram limpos e desinfetados.

2.2- Ensaio de avaliação de resistência de linhagens de feijoeiro ao nematode *Meloidogyne javanica*

2.2.1- Obtenção do material vegetal

As linhagens X08, X09, X10 e X15 (Figura 2.1) de *Phaseolus coccineus*, foram fornecidas pela empresa Aromas & Flores, estando a ser alvo de melhoramento e experimentação para o desenvolvimento de porta-enxertos de feijoeiro. As sementes foram esterilizadas superficialmente com lixívia não diluída (cerca de 5% de hipoclorito de sódio) durante 1 minuto, sendo depois lavadas com água abundante e colocaram-se a germinar em papel absorvente humedecido com água destilada a temperatura ambiente. Quando as sementes germinaram e alcançaram uma radícula máxima de 2cm foram transferidas para vasos de cerca de 1 L de capacidade, tendo estes sido previamente preparados conforme descrito seguidamente.



Figura 2.1 – Sementes das linhagens de feijoeiro *Phaseolus coccineus* utilizadas no ensaio de resistência a *Meloidogyne javanica*.

2.2.2 – Desenho experimental

Para a avaliação da resistência das quatro linhagens de feijoeiro a *Meloidogyne javanica*, foi realizado um ensaio em vasos com plantas inoculadas com nemátodes e plantas-testemunha que não receberam qualquer inóculo (testemunha negativa), de cada uma das linhagens de feijoeiro. Foram ainda utilizadas, como testemunha positiva da condição do inóculo de nemátodes plantas de tomateiro *Solanum lycopersicum* suscetíveis, das cultivares ‘Moneymaker’ ou ‘Tiny Tim’, sujeitas às mesmas condições de ensaio.

O desenho experimental utilizado neste ensaio foi completamente casualizado, tendo os vasos com os vários tratamentos sido colocados aleatoriamente na câmara de crescimento, conforme representado na figura 2.2. O esquema de tratamentos foi o seguinte:

- X08N – cultivar 08 inoculada com nemátodes
- X08T - cultivar 08 não inoculada
- X09N – cultivar 09 inoculada com nemátodes
- X09T – cultivar 09 não inoculada
- X10N – cultivar 10 inoculada com nemátodes
- X10T - cultivar 10 não inoculada
- X15N – cultivar 15 inoculada com nemátodes
- X15T - cultivar 15 não inoculada

Cada tratamento teve 10 repetições.

08N6	08T7	08N8	10N9	08T10	08N4	08T3	10N8	10N7	10T6	09N8	T6	15N1	10T9	T9	15N4
10N10	09N3	09T9	08T6	15T6	08T1	09N6	09T10	08T8	15N8	09N9	15T8	10N5	10T1	10N6	08T4
15T10	T2	09N5	15N3	08T9	15T2	10T3	08T5	09N7	09T4	09N1	08N2	09T1	10T5	15T1	09N10
10T8	T3	10N1	09T3	T7	15N5	08T2	10N4	15N9	09T8	08N3	08N5	08N1	15N2	15T7	15N6
09T6	10N3	15N7	10T7	10T4	09T2	10T10	09N2	15T5	T10	15T4	08N7	T8	T4	T11	T1
----	15T3	----	T5	----	----	08N10	----	15T9	09T7	08N9	15N10	09N4	10N2	09T5	10T2
Linhagens de Feijoeiro:															
X08	X09	X10	X15	Tomate											

Figura 2.2 - Disposição dos vasos na câmara de crescimento.

2.2.3 - Práticas culturais

2.2.3.1 - Preparação dos vasos

Para a realização do ensaio foi necessário esterilizar uma mistura de solo: areia (1:1) na autoclave, um aparelho utilizado para esterilizar materiais através do calor húmido sob pressão. Os sacos de solo foram colocados fechados na autoclave e autoclavados a uma temperatura de 122 °C durante uma hora. Após a esterilização, deixou-se arejar a mistura alguns dias para eliminar possíveis compostos fitotóxicos voláteis. A esterilização foi feita para evitar contaminações por parte de infestantes, nemátodes ou doenças eventualmente presentes no solo, e ainda para eliminar rizóbios, de modo a avaliar apenas o efeito da inoculação dos nemátodes sobre os feijoeiros.

Antes de se colocar o solo esterilizado nos vasos de plástico foi realizada uma lavagem e desinfecção dos vasos com lixívia diluída. Foi colocado um saco de plástico em cada vaso para que a água da rega não entrasse em contacto com os outros vasos para evitar qualquer deslocação dos nemátodes entre vasos.

Para fornecer as necessidades nutritivas das plantas ao longo dos dois meses de ensaio, foi realizada uma fertilização na qual foi aplicado um fertilizante mineral NPK (Foskamónio 10:10:10), aplicando-se 1,8g por vaso.

2.2.3.2- Transplantação

A transplantação é um procedimento que requer alguns cuidados para que não haja estragos nas plantas. As sementes germinadas foram transferidas para o solo, colocando-se apenas uma semente por vaso. A transplantação foi realizada pela manhã juntamente com a identificação dos vasos, utilizando uma etiqueta nos sacos de plástico. Após a transplantação e identificação foi realizada uma rega a todos os vasos para evitar que ocorresse crise de transplantação. De seguida, os vasos foram colocados aleatoriamente na câmara (Figura 2.3)



Figura 2.3 – Vasos colocados aleatoriamente na câmara.

2.2.3.3- Tutoragem

A tutoragem é fundamental para a cultura do feijão-verde. Esta operação foi realizada com estacas de metal de apoio (desinfetadas previamente) (Figura 2.4). Colocou-se também uma rede para as estacas não ficarem inclinadas, a uma altura de 93cm (Figura 2.5).



Figura 2.4 e 2.5 – Vasos do ensaio na câmara de crescimento com estacas de metal e rede.

2.2.3.4- Rega

As plantas foram regadas conforme necessário, sendo regadas com pouca quantidade de água mas frequentemente, de modo a manter a humidade do solo, e regando-se sempre com água destilada, para evitar a contaminação do ensaio. Usou-se para o efeito um goblé desinfetado.

2.2.3.5- Desponta

Durante o ensaio foram realizadas três despontas (8/4, 17/4 e 29/4). As despontas dos feijoeiros foram realizadas com cerca de 93cm de altura, ou seja, a altura das estacas de metal.

2.2.4- Avaliação das plantas – parte aérea e raízes

Para a avaliação das plantas (não inoculadas e inoculadas) durante o ensaio foram registados os seguintes parâmetros:

- Comprimento do caule;
- Desponta;
- Número de folhas e flores;
- Cor da flor.

No fim do ensaio, a avaliação das plantas (não inoculadas e inoculadas), da parte aérea e raízes foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Número de folhas;
- Número de vagens;
- Peso fresco;
- Peso seco;

Para cada planta do ensaio, foi determinado o peso fresco e o peso seco (após secagem numa estufa a 50°C) da parte aérea e da parte radicular. Com estes dados pretendeu-se avaliar o efeito da infeção por *M. javanica* no desempenho das linhagens.

2.2.5- Inoculação do nemátode *Meloidogyne javanica*

2.2.5.1- Obtenção e preparação do inóculo

Desenvasaram-se tomateiros previamente infetados e com bastantes massas de ovos visíveis de *Meloidogyne javanica* de culturas mantidas em laboratório na Escola Superior Agrária de Ponte de Lima e originalmente cedidas pela Professora Doutora Isabel Abrantes, do Laboratório de Nematologia da Universidade de Coimbra. As raízes foram lavadas para as libertar das partículas do solo aderentes e posteriormente cortadas em pedaços de cerca de 2-3cm, cortando-se a meio galhas grandes que podiam ter massas de ovos no seu interior.

Preparou-se uma solução de hipoclorito de sódio a 0.5%, diluindo-se lixívia tradicional (sem detergente) 10 x (20ml de lixívia em 180ml de água).

Colocaram-se as raízes cortadas num frasco schott de 500ml de capacidade e adicionaram-se 200ml da solução de hipoclorito de sódio a 0.5%. Rolhou-se o frasco e agitou-se vigorosamente durante dois minutos. Depois disto, transferiu-se o conteúdo de frasco para um conjunto de crivos metálicos, o superior de 75µm (recolhe detritos e pedaços de raiz) e o inferior de 20 µm (onde foi retida a suspensão de ovos). Para eliminar a lixívia passou-se bem por água o conteúdo dos crivos e recolheu-se a suspensão de ovos com um esguicho de água destilada para um copo graduado de 250ml de capacidade. Ajustou-se o volume da suspensão com água destilada a um volume conhecido e manteve-se em agitação num agitador magnético. Desta suspensão foram contabilizados os ovos e J2 de NGR à lupa em três amostras de 1ml da suspensão obtida, estimando-se então o inóculo total e o volume da suspensão a inocular para obter 5000 ovos e jovens por vaso.

2.2.5.2- Inoculação das plantas

Ao atingirem o estado de desenvolvimento de dois pares de folhas verdadeiras, os feijoeiros dos tratamentos “N” e os tomateiros foram inoculados com cerca de 5000 ovos e J2 de *Meloidogyne javanica*. Para a inoculação das plantas, primeiramente fez-se três furos no solo de cada vaso a inocular até a zona da raiz (cerca de 3cm de profundidade) com uma vareta de vidro. De seguida pipetou-se a suspensão distribuindo o volume necessário por vaso pelos três furos. Taparam-se os furos com o solo e por fim regaram-se os vasos.

2.2.6 - Avaliação da resistência ao nemátode *Meloidogyne javanica*

A avaliação da resistência/ tolerância das plantas foi realizada sessenta dias após a inoculação, sendo desenvasados todos os vasos para analisar a parte aérea e a parte radicular separadamente, com os parâmetros referidos anteriormente. Para avaliar a reprodução dos nemátodes e os danos à raiz, foram registados o número de galhas e de massas de ovos produzidas em cada sistema radicular, como a seguir se apresenta.

2.2.6.1- Determinação do índice de galhas e massas de ovos e do fator de reprodução

A determinação do índice de galhas e massas de ovos realizou-se sessenta dias após a inoculação. As plantas foram desenvasadas e as raízes lavadas com água da torneira de modo a eliminar o solo aderente. De seguida, as raízes foram coradas numa solução de Floxina B (Hartman, K. 1983) para evidenciar as massas de ovos dos nemátode. Para tal, colocaram-se as raízes lavadas num copo de 500 ml de capacidade e adicionou-se a solução de Floxina B 0,0015% de modo a cobrir as raízes por completo, deixando atuar por cerca de 20 minutos. Depois disto, retiraram-se as raízes da solução corante passando-as por água de modo a eliminar o excesso de corante. Por fim, foram então observadas cuidadosamente para determinação do número de galhas e massas de ovos produzidos por planta.

Para determinar o número de ovos produzidos (população final - Pf) do nemátode, foram separadas de cada planta até 10 massas de ovos para um microtubo contendo água destilada, sendo os microtubos guardados no frigorífico até ao seu processamento. No laboratório, adicionou-se cerca de 200 µl de lixívia pura a cada tubo, que foi então agitado no vortex durante 30 segundos, para desfazer as massas gelatinosas. A suspensão de ovos resultante foi então transferida para um goblé de 20 ml de capacidade com o auxílio de um esguicho, sendo o volume total ajustado a 10 ml. Foram de seguida contabilizados os ovos e J2 em

subamostras de 0.5 ml à lupa, o que permitiu estimar o número total de ovos produzidos por planta (Pf).

Para calcular o Factor de Reprodução (Rf), foi dividido o valor de Pf pelo da população inicial (Pi), que corresponde ao número de ovos e J2 inoculados, ou seja, 5000.

Para cada planta, foi calculado o Índice de massas de Ovos (EI) e o Índice de Galhas (GI) (Taylor e Sasser, 1978) (Quadro 2.1). Foi também calculado o Índice de Reprodução relativo (RI) utilizando para o efeito os resultados de Rf padrão referentes à linhagem de feijoeiro mais suscetível, e calculando os RI para cada linhagem como uma percentagem de Rf em relação ao Rf padrão (Hadisoeganda e Sasser, 1982) (Quadro 2.2). Os dados sobre a reprodução dos nemátodes (EI, RI e Rf) permitem avaliar a eficiência como hospedeiro de cada cultivar (indicativo de resistência), enquanto o GI fornece uma indicação dos danos à planta causados pelos nemátodes (indicativo de tolerância).

Quadro 2.1 – Índice de Massas de Ovos (EI) e índice de Galhas (GI) de Taylor e Sasser (1978).

Nº de massas de ovos / Nº de galhas	EI / GI
0	0
1-2	1
3-10	2
11-30	3
31-100	4
>100	5

Fonte: Taylor e Sasser, 1978.

Quadro 2.2 – Índice de Reprodução Relativa (RI) de Taylor e Sasser (1978).

$RI = Rf \text{ teste} * 100\% / Rf \text{ padrão}$
Rf test – fator de reprodução da cultivar testada
Rf padrão – fator de reprodução da cultivar suscetível da mesma espécie de referência
Rf – fator de reprodução: população final / população inicial

Fonte: Taylor e Sasser, 1978.

2.2.6.2- Avaliação da resistência

Os índices de galhas, massas de ovos, reprodução e o fator de reprodução foram comparados com os valores de referência para avaliar a resistência ou tolerância das linhagens de feijoeiro testadas em relação aos NGR *M. javanica*. Assim, com base nos resultados obtidos para o EI e para o RI, foram categorizadas as linhagens segundo as classificações de resistência de Hadisoeganda e Sasser (1982) (Quadro 2.3) e de Taylor e Sasser (1978), respectivamente (Quadro 2.4). Os resultados referentes a GI e Rf, foram utilizados para a classificação em graus de resistência DR, informativos sobre a resistência ou tolerância das linhagens de feijoeiro (Sasser *et al.*, 1984) (Quadro 2.5).

Quadro 2.3 – Classificação de resistência pelo EI.

EI médio	Resistência
0-1	HR – altamente resistente
1.1-3.0	VR – muito resistente
3.1-3.5	MR – moderadamente resistente
3.6-4.0	SR – pouco resistente
4.1-5.5	S - suscetível

Fonte: Hadisoeganda e Sasser, 1982.

Quadro 2.4 – Classificação de resistência pelo RI.

RI (%)	Resistência
0	Imune
1-10	VR – muito resistente
10-25	MR – moderadamente resistente
26-50	SR – pouco resistente
>50	Suscetível

Fonte: Taylor e Sasser, 1978.

Quadro 2.5 – Avaliação da resistência e tolerância por Sasser *et al.* (1984).

GI	Rf	DR
≤ 2	≤ 1	Resistente
≤ 2	> 1	Tolerante
> 2	≤ 1	Hipersuscetível
> 2	> 1	Suscetível

Fonte: Sasser *et al.*, 1984.

2.3 – Ensaio de avaliação da resistência de linhagens de feijoeiro ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

2.3.1- Material vegetal

Para a avaliação da resistência de linhagens de feijão a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* utilizaram-se as cultivares “Aintree” e “White Emergo-Snowy” (*Phaseolus coccineus*), a cultivar Oriente (*Phaseolus vulgaris*) e cinco linhagens de feijoeiro X07, X08, X09, X10 e X15.

2.3.2 – Desenho experimental

O desenho experimental utilizado neste ensaio foi completamente casualizado, com 16 tratamentos e 6 repetições, tendo os vasos com os vários tratamentos sido colocados aleatoriamente na câmara de crescimento, conforme representado na figura 2.6. O esquema de tratamentos foi o seguinte:

- X07F – cultivar 07 inoculada com Fop
- X07T – cultivar 07 não inoculada
- X08F – cultivar 08 inoculada com Fop
- X08T – cultivar 08 não inoculada
- X09F – cultivar 09 inoculada com Fop
- X09T – cultivar 09 não inoculada
- X10F – cultivar 10 inoculada com Fop
- X10T – cultivar 10 não inoculada
- X15F – cultivar 15 inoculada com Fop
- X15T – cultivar 15 não inoculada
- Oriente F – cultivar Oriente inoculada com Fop
- Oriente T – cultivar Oriente não inoculada
- Aintree F – cultivar Aintree inoculada com Fop
- Aintree T – cultivar Aintree não inoculada
- White Emergo F – cultivar White Emergo C inoculada com Fop
- White Emergo T – cultivar White Emergo C não inoculada

A cultivar comercial de feijão-verde “Oriente”, suscetível a Fop, foi utilizada como testemunha da suscetibilidade a este agente patogénico.

WF2	7F2	15T3	AF2	WT6	9F5	80T6	80T3	AF6	10T2	80F6	10F4	10T3	WF6	OF2
9T1	9T5	WT1	80F1	15F5	9T2	15T5	9F4	80T1	80F3	10F1	AF5	WT3	7F1	80F4
9T3	10F5	AT6	AF4	15F1	OF4	OF3	80T4	80T2	WF4	15T1	9F3	WF3	WT4	---
7F4	15T4	10T4	80F5	OT3	15F3	7T2	10F2	9F2	80T5	AT2	7T1	15F4	OT2	---
9F6	9T6	AT5	AT4	7F3	OF1	10F3	9F1	WT5	OT1	10T1	10T5	WF5	7T3	---
10F6	15F2	OT6	80F2	WF1	15T6	9T4	AT1	WT2	AF3	AF1	15F6	15T2	AT3	---
Cultivares e linhagens de feijoeiro														
X07	X09	X10	X15											
X80	Oriente	Aintree	White Emergo											

Figura 2.6 - Disposição dos vasos na câmara de crescimento.

2.3.3- Inoculação das plantas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

2.3.3.1- Pré-germinação de sementes

Sementes de cultivares de feijão-verde (*Phaseolus vulgaris*), feijoca (*P. coccineus*) e linhagens feijoeiro selecionadas, foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 5% durante um minuto e lavadas cinco vezes em água. As sementes foram pré-germinadas em papel de filtro humedecido e mantidas à temperatura ambiente durante dois dias. Seguidamente procedeu-se à sua transplantação para tabuleiros de polietileno, contendo areia esterilizada e mantidas em câmara com temperatura de 28°C. Sete dias após a germinação procedeu-se à inoculação das raízes, utilizando a metodologia descrita por vários autores (Pastor-Corrales e Abawi (1987), Abawi e Pastor-Corrales, (1990)), descrita seguidamente.

2.3.3.2- Isolamento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

A estirpe utilizada neste ensaio foi isolado a partir de plantas da cultivar “Oriente” recolhidas numa estufa comercial de feijão-verde, localizada em Arazede. Os feijoeiros em plena floração e com frutos já vingados (abril de 2015) evidenciavam sintomas graves e típicos da fusariose vascular. Apesar dos meios de luta químicos utilizados para controlar o fungo, as plantas acabaram por morrer, conduzindo à perda total da produção. As plantas selecionadas foram transportadas para o laboratório da ESA/IPVC e conservadas a 4°C até posterior

manipulação. Para o isolamento do fungo seguiu-se a metodologia descrita por Leslie e Summerell (2006). Fragmentos do caule com sintomas da doença foram desinfetados externamente com álcool a 70% e cortados longitudinalmente. Destacaram-se porções do tecido interno localizado na área de transição entre uma zona sã e uma zona com tecidos necrosados, que foram transferidos para placas de Petri com meio PDA (potato dextrose agar, Difco: 39 g, 1 l de água). As placas foram incubadas a 25°C durante 7 dias, na ausência de luz. Os isolamentos obtidos foram repicados até se obterem culturas puras, que foram preservados em meio PDA a 4°C. Dos isolados obtidos, utilizou-se neste estudo a estirpe FA-15.

2.3.3.3- Preparação de inóculo e inoculação de plantas

Para a preparação de inóculo, discos de micélio (0,4 cm) retirados de uma cultura ativa da estirpe FA-15 foram repicados para meio PDA e incubados durante sete dias a 25°C na ausência de luz. A massa de esporos foi removida, adicionando-se 10 ml de água destilada esterilizada em cada placa. A suspensão obtida foi filtrada através de 4 camadas de gase esterilizada para remoção de fragmentos de micélio, e a concentração final ajustada a 10^6 conídios mL⁻¹ utilizando a camara de contagem de Neubauer (Alves-Santos *et al.*, 2002).

2.3.3.4- Inoculação das raízes e transplantação para vasos

Para a inoculação das plantas seguiu-se a metodologia descrita por Abawi e Pastor-Corrales, (1990). Após germinação das sementes, e no estado de desenvolvimento de dois pares de folhas verdadeiras, os feijoeiros foram removidas dos tabuleiros e as raízes cuidadosamente lavadas em água para remoção da areia aderente. Procedeu-se ao corte de aproximadamente 1 cm da sua extremidade sendo as raízes remanescentes dos feijoeiros dos tratamentos F mergulhadas numa suspensão de macro e microconídios de Fop (10^6 esporos mL⁻¹) durante 5 minutos. As raízes de igual número de feijoeiros dos tratamentos T (testemunha), foram mergulhadas durante 5 minutos em água destilada esterilizada.

As plantas inoculadas, e as plantas testemunha não inoculadas, foram transplantadas para vasos de polietileno previamente identificados com os diferentes tratamentos, contendo substrato esterilizado, constituído por uma mistura de turfa e vermiculite (3:1). Procedeu-se a uma rega com água destilada esterilizada, e seguidamente à colocação de tutores individuais em cada vaso. As plantas foram mantidas numa câmara de crescimento com ambiente controlado já descrito no ponto 2.1.

2.3.4- Práticas culturais

A condução da cultura na câmara de crescimento, nomeadamente a tutoragem, rega e despona dos feijoeiros realizou-se de acordo com a metodologia já descrita anteriormente no ponto 2.2.3.3, 2.2.3.4, 2.2.3.5, respetivamente.

2.3.5 - Avaliação da resistência ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

A avaliação da resistência/suscetibilidade das cultivares em estudo foi avaliada durante 5 semanas após inoculação, através de testes-padrão descritos por vários autores (Pastor-Corrales e Abawi, 1987; Alves-Santos *et al.*, 2002), tendo-se realizado observações aos 21, 30 e 40 dias após a inoculação das plantas. Utilizou-se a escala CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) descrita por Pastor-Corrales e Abawi (1987) utilizada para avaliação de resistência de cultivares de feijão rasteiro (Quadro 2.6 e Figura 2.7). O ensaio foi dado por terminado com as observações realizadas 5 semanas após a inoculação das raízes.

Quadro 2.6 - Escala CIAT para avaliação da severidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijoeiro.

Índice	Sintomas
1	Planta sem sintomas externos
3	1-10% de folhas com sintomas: leve murchidão (3 folhas), clorose e descoloração vascular do hipocótilo
5	11-25% de folhas com sintomas: murchidão moderada e clorose das folhas/planta, e descoloração vascular extensa até ao primeiro nó
7	26-50% de folhas com sintomas: murchidão severa e clorose das folhas/planta, e descoloração vascular por toda a haste e pecíolo;
9	Planta morta ou gravemente doente, com 100% da folhagem exibindo murchidão e clorose, necroses e/ou desfoliação prematura.

Fonte: Pastor-Corrales e Abawi (1987).

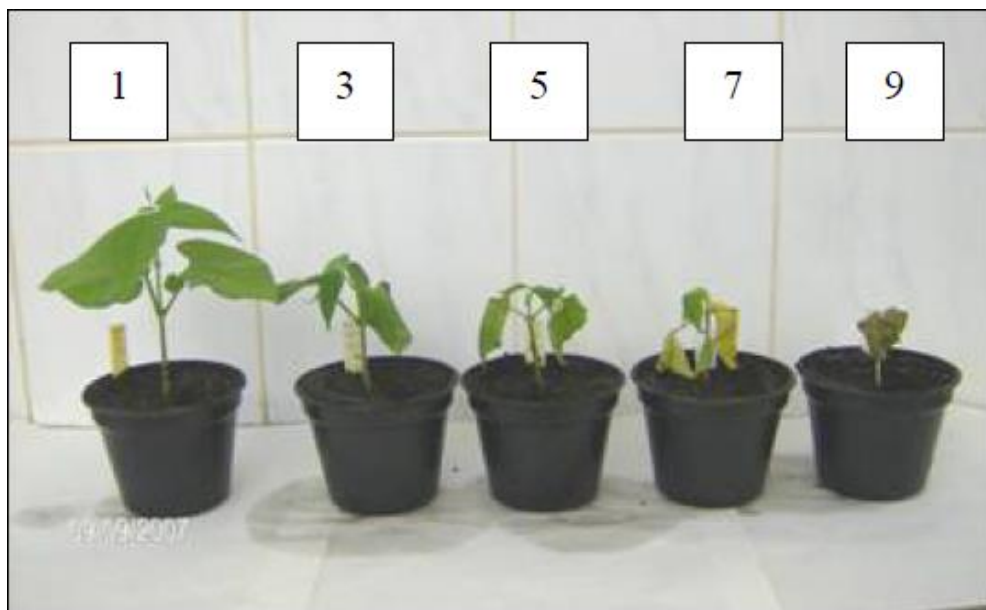


Figura 2.7 – Escala de severidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijoeiro (Pereira, 2007).

De acordo com a escala referida, as linhagens avaliadas de 1-3 serão classificadas como resistentes, 3,1-6 como intermédias, e de 6,1-9 como suscetíveis (Pastor-Corrales e Abawi, 1987; Salgado e Schwartz, 1993; Elena e Papas, 2002; Pereira *et al.* 2008, 2013).

2.3.6- Avaliação da colonização dos tecidos internos do caule de feijão

Vinte e um dias após a inoculação das raízes, e após registo dos sintomas externos, procedeu-se a uma amostragem das plantas inoculadas com Fop e não inoculadas, que foram analisadas em laboratório para observação de sintomas internos da doença. Para pesquisa da presença de Fop nos tecidos do caule e para o re-isolamento da estirpe inoculada procedeu-se como já referido no ponto 2.3.3.2.

2.3.7- Identificação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

A identificação da estirpe FT.15 foi efetuada a partir das características morfológicas do micélio e dos esporos, e através de métodos moleculares baseados na amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer).

A extração de DNA total de Fop foi realizada utilizando o kit comercial DNeasy® Plant Mini kit da Qiagen (Califórnia, Estados Unidos).

A amplificação da região ITS foi efetuada utilizando o par de primers específicos ITS 1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') de

acordo com a metodologia descrita por White *et al.* (1990). As reações de amplificação decorreram num amplificador modelo T100 Thermal Cycler (BioRad) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 40 ciclos que consistem na desnaturação a 94°C durante 30 segundos, emparelhamento de primers a 50°C durante 1 minuto, e extensão dos primers a 72°C durante 1 minuto. Por fim a última etapa consistiu numa extensão final a 72°C durante 10 minutos

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X. Para identificação de Fop, os produtos obtidos na reação PCR foram enviados à STAB VIDA para sequenciação. Posteriormente, e com o objetivo de estabelecer a identidade da amostra, realizou-se a comparação das sequências obtidas com as existentes no GenBank. Para tal utilizou-se o programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) com sequências depositadas na base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

2.4 - Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com o programa SPSS for Windows 15.0. Foi inicialmente verificada a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. Foram depois realizadas análises fatoriais para avaliar o efeito do tratamento (N ou T) e/ou da cultivar, através de análise de variância, à probabilidade de 5%. Os resultados significativos foram ainda comparados pela análise de LSD a 5%.

3 – RESULTADOS

3.1- Avaliação da resistência/tolerância de linhagens de feijoeiro a nemátode *Meloidogyne javanica*.

O tratamento de inoculação com nemátodes *Meloidogyne javanica* resultou num peso fresco da parte aérea significativamente menor em relação às testemunhas não inoculadas ($p < 0.05$), um efeito independente da linhagem analisada (X08, X09, X10 e X15). Onde se verificou menor diferença de peso fresco da parte aérea entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas foi na linhagem X10 (Figura 3.1).

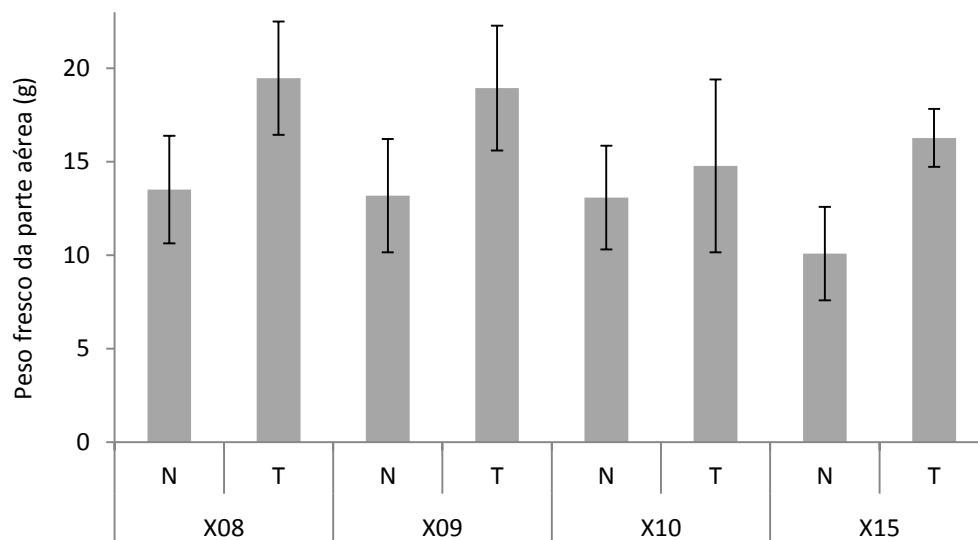


Figura 3.1- Pesos frescos (g) da parte aérea das plantas das linhagens X08, X09, X10 e X15, 60 dias após a inoculação com 5000 ovos jovens de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. N – plantas inoculadas; T- plantas não-inoculadas (testemunha). Os valores são média \pm erro padrão.

Em relação ao peso fresco da parte radicular, as plantas não inoculadas obtiveram em média um peso maior que as plantas inoculadas, com exceção da cultivar X10 em que as plantas inoculadas obtiveram maior peso fresco da parte radicular do que as plantas não inoculadas (Figura 3.2). No entanto, não houve diferenças significativas para estes resultados.

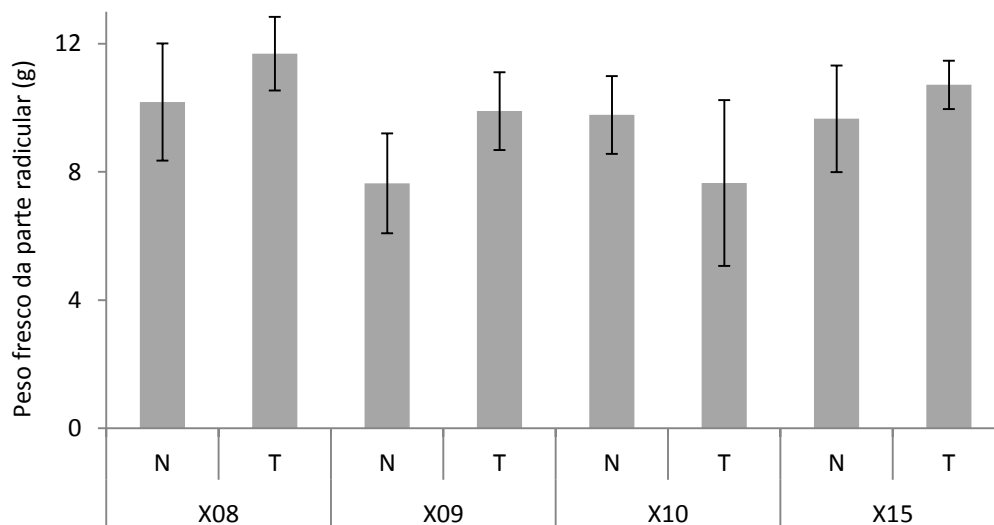


Figura 3.2 – Pesos frescos da parte radicular das plantas das linhagens X08, X09, X10 e X15, 60 dias após a inoculação com 5000 ovos e jovens de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. N- plantas inoculadas; T- plantas não-inoculadas (testemunha). Os valores são média \pm erro padrão.

Entre as linhagens analisadas, parece haver um investimento de cerca de 30% na parte radicular e 70% na parte aérea, um valor que se apresenta aproximadamente constante nos vários tratamentos (Figura 3.3).

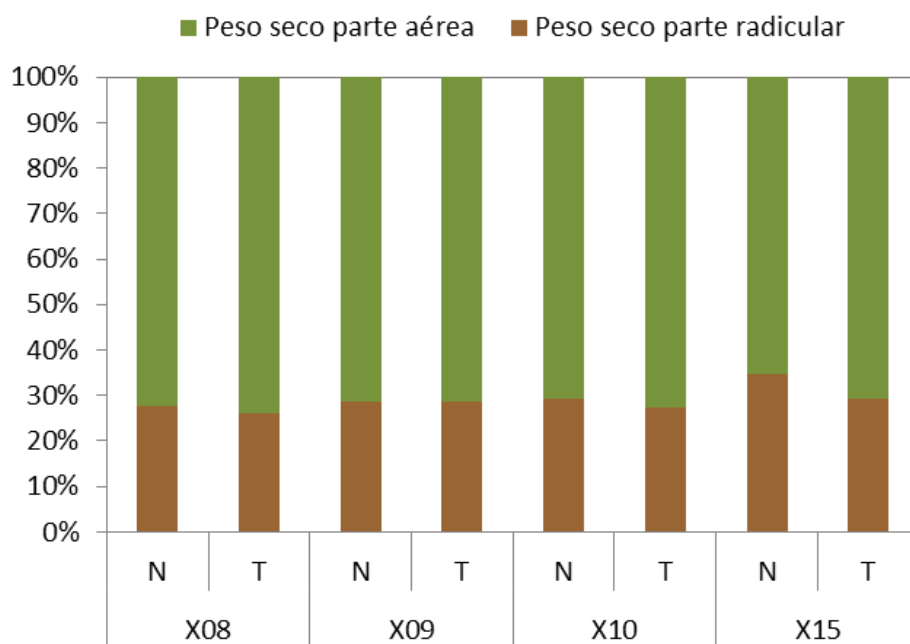


Figura 3.3- Proporção percentual de peso seco da parte aérea e da parte radicular das plantas das linhagens X08, X09, X10 e X15, 60 dias após a inoculação com 5000 ovos e jovens de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. N- plantas inoculadas; T- plantas não-inoculadas (testemunha).

Os nemátodes infetaram com sucesso os tomateiros utilizados como testemunha positiva da condição do inóculo: foram produzidas em média mais de 100 galhas e massas de ovos por sistema radicular, tendo a população de nemátodes aumentado mais de 17 vezes em relação ao inóculo (5000 ovos e jovens de segundo estágio).

Em todas as linhagens de feijoeiro testadas houve formação de galhas, induzidas pelo nemátode nas raízes inoculadas (N), ausentes em plantas não-inoculadas (T).

As plantas da linhagem X09 sofreram significativamente menos danos que as da linhagem X10 quando infetadas com os NGR (Figura 3.4A), pois continha um menor número de galhas nas raízes. As raízes das plantas da cultivar X10, tendo um maior número de galhas, suportaram também um maior número de massas de ovos que as outras linhagens (3.4B). Esta linhagem obteve também uma maior reprodução do nemátode (Figura 3.4C), cujo nível populacional aumentou em média 16.8 vezes em relação ao inicial.

Estes resultados só foram estatisticamente significativos com comparação com a linhagem X09, que apresentou significativamente menos galhas, menos massas de ovos e correspondentemente menos ovos produzidos pelos nemátodes. Embora significativamente menor, o fator de reprodução (Rf) dos nemátodes nas plantas da linhagem X09 foi, em média, cerca de 2.75, o que se traduz numa mais que duplicação do número inicial de nemátodes (5000 ovos e jovens).

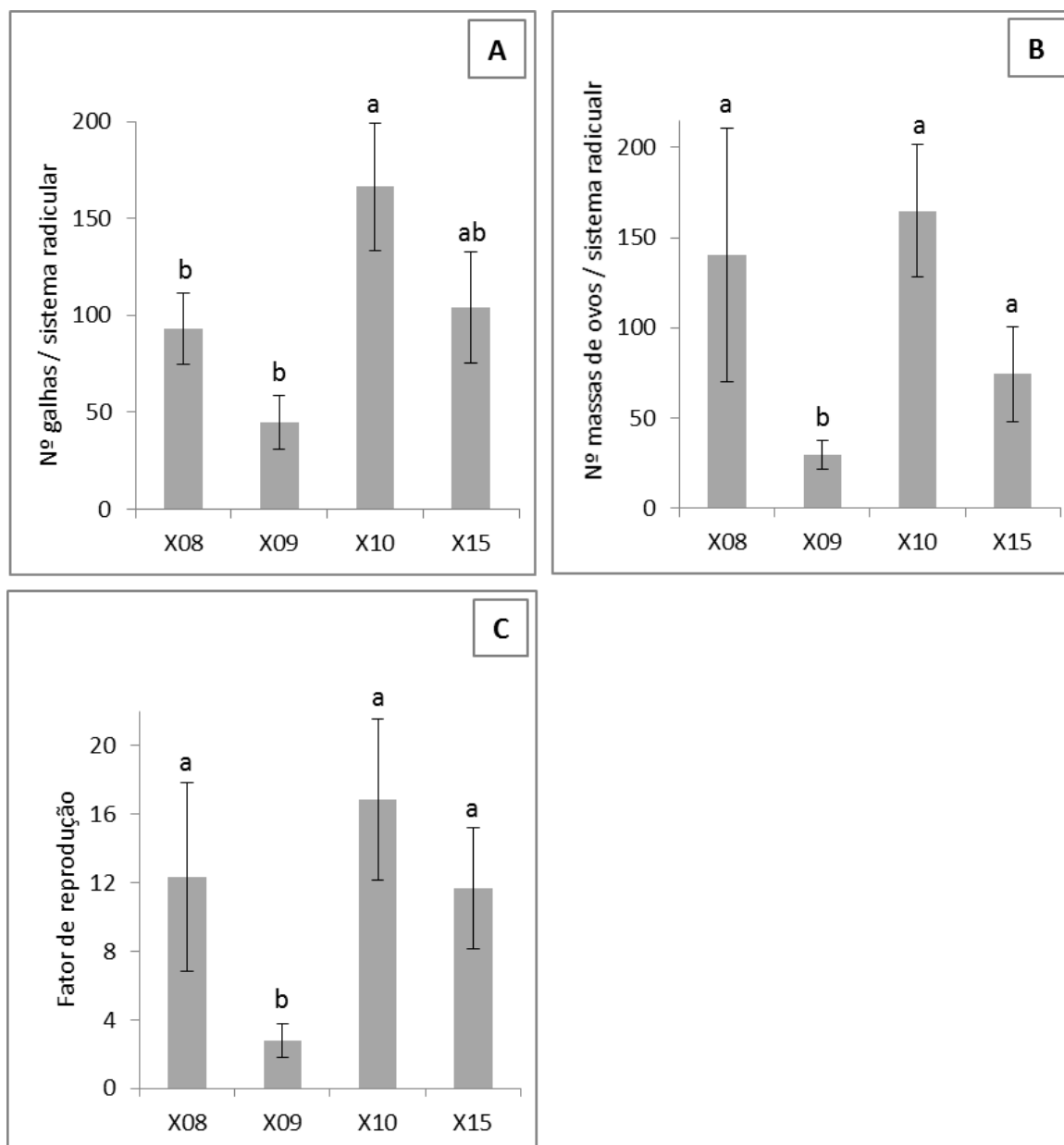


Figura 3.4- Número de galhas (A) e de massas de ovos (B) produzidas no sistema radicular das plantas das linhagens X08, X09, X10 e X15 resultantes da infecção por *Meloidogyne javanica*, e fator de reprodução do nemátode (C) em relação á população inicial (5000 avos e jovens de segundo estágio), 60 dias após a inoculação. Os valores são média \pm erro padrão. Valores acompanhados da mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com análise de LSD ($p < 0.05$).

Os resultados descritos acima correspondem às classificações constantes no quadro seguinte, que permite obter uma comparação da reação das várias linhagens testadas à infecção pelo nemátode (Quadro 3.1).

Quadro 3.1- Índice de massas de ovos, de galhas e de reprodução relativa de *Meloidogyne javanica* nas linhagens avaliadas. n- número de repetições; EI – índice de massas de ovos; GI – índice de galhas; RI (%) – índice de reprodução relativa, tomando como referência a cultivar X10.

Cultivar	n	EI	GI	RI (%)
X08	9	4.0	4.2	73
X09	8	3.3	3.5	16
X10	9	4.7	4.6	100
X15	6	3.9	4.3	69

Das linhagens testadas, a X10 foi a que apresentou um índice de massas de ovos (EI) e de galhas (GI) mais elevado, sendo estes valores superiores a 4.1, classificando-se como suscetível (S) (Quadro 3.1). A linhagem X09, pelo contrário, foi a que apresentou os índices EI e GI mais baixos, 3.3 e 3.5 respectivamente (Quadro 3.1). De acordo com a classificação de Hadisoeganda e Sasser, esta linhagem teria sido classificada como moderadamente resistente (MR).

A linhagem X10 demonstrou a mais elevada eficiência hospedeira de todas as linhagens testadas, sendo o valor de Rf obtido para esta linhagem comparável ao obtido para os tomateiros (testemunha positiva). Assim, a linhagem X10 foi escolhida como referência da espécie *Phaseolus coccineus* para o cálculo do índice de reprodução (RI). De acordo com a classificação de Taylor e Sasser (1978), dos valores de RI constantes da tabela, conclui-se que, comparativamente à cultivar X10, as linhagens X08 e X15 seriam suscetíveis (S) e a cultivar X09 moderadamente resistente (MR).

Dos resultados analisados, têm especial relevância o índice de galhas (GI) e o fator de reprodução (Rf), que são utilizados para a avaliação objetiva da resistência e tolerância das plantas a nemátodes-das-galhas-radiculares, de acordo com a classificação de Sasser *et al.*, 1984 (Quadro 3.2).

Todas as linhagens testadas foram hospedeiras eficientes, permitindo o aumento da população de nemátodes em relação ao número inicial e portanto, um Rf superior a 1. (Quadro 3.2). Também todas as linhagens sofreram danos nas raízes resultante da infecção por nemátodes, ilustrado pelo GI, superior a 2 (Quadro 3.2). Segundo Sasser *et al.* (1984),

da conjugação destes dois parâmetros conclui-se que todas as linhagens testadas foram suscetíveis a *Meloidogyne javanica* (Quadro 3.2).

Quadro 3.2 – Fator de reprodução, eficiência do hospedeiro, índice de galhas, danos no hospedeiro e grau de resistência a *Meloidogyne javanica* nas linhagens analisadas. n- número de repetições; Rf – fator de reprodução; GI - índice de galhas; DR - Grau de Resistência; *os dados apresentados são a média \pm desvio-padrão das repetições analisadas.

Cultivar	n	Rf*	Eficiência do hospedeiro	GI*	Danos ao hospedeiro	DR
X08	9	12.3 \pm 5.5	>1	4.2 \pm 0.2	>2	Suscetível
X09	8	2.8 \pm 1.0	>1	3.5 \pm 0.3	>2	Suscetível
X10	9	16.8 \pm 4.7	>1	4.6 \pm 0.2	>2	Suscetível
X15	6	11.7 \pm 3.6	>1	4.3 \pm 0.2	>2	Suscetível

3.2- Avaliação da resistência/tolerância de linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*

3.2.1. Sintomas de fusariose vascular do feijoeiro

As plantas de feijão-verde da cultivar “Oriente” com sintomas de fusariose estavam a ser produzidas em estufa na época da primavera. Encontravam-se em plena floração, existindo grande número de frutos vingados (Figura 3.5 A, B).

Elevado número de plantas apresentavam os sintomas típicos da fusariose do feijoeiro, nomeadamente murchidão da planta, amarelecimento, senescência prematura e queda das folhas, e paragem do crescimento (Figura 3.5. A a E).

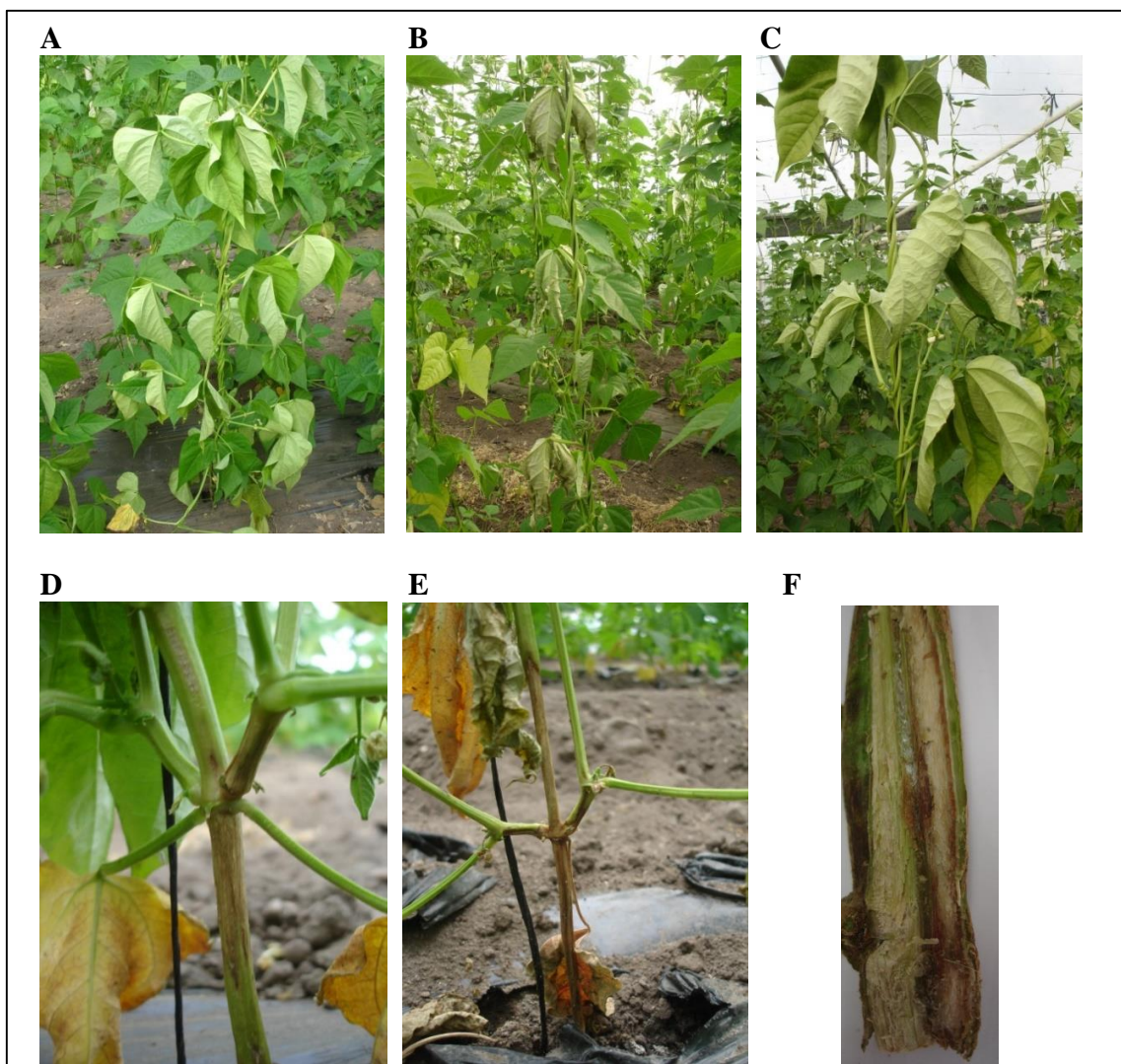


Figura 3.5 – Sintomas de fusariose vascular do feijoeiro em plantas da cultivar “Oriente”, a partir das quais se obtiveram vários isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp *phaseoli* em laboratório : A, B e C – murchidão de plantas na fase de floração e vingamento do fruto. D e E- pormenor de necroses externos no caule onde é evidente a progressão da doença, e murchidão seguida de amarelecimento das folhas. F-Pormenor de corte longitudinal do caule, com sintomas de acastanhamento dos vasos (Imagens por Luísa Moura, abril 2015).

O amarelecimento do caule e necroses longitudinais eram evidentes, observando-se a progressão dos sintomas no sentido ascendente, o que indicava a presença e progressão do fungo nos tecidos vasculares das plantas (Figura 3.5 D e E). A descoloração e necrose dos tecidos vasculares, visível após o corte longitudinal dos caules (Figura 3.5 F) completou o quadro sintomatológico desta doença na cultura de feijão-verde em estufa.

3.2.2. Isolamento e identificação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*

O isolamento do fungo a partir de caules de feijão-verde da cultivar “Oriente” com sintomas típicos da doença em estufa comercial, originou colônias de cor branca que com o tempo adquiriram a cor rosa (Figura 3.6 A). Após inoculação de plantas de feijoeiro com a estirpe FA-15 para os ensaios de resistência/tolerância em condições controladas, fez-se o seu re-isolamento a partir de plantas assintomáticas 21 DAI (Figura 3.6 B). As colônias apresentavam coloração rosa-arroxeadas com micélio branco abundante ao fim de 7 dias de incubação a 25°C, na ausência de luz (Figura 3.6 B). A observação de micélio ao microscópio revelou a presença de macro e micro conídios característicos de *Fusarium*. A análise do substrato utilizado nos vasos das plantas inoculadas, analisado 60 dias após inoculação permitiu isolar colônias de cor rosada, idênticas às isoladas do caule de feijão-verde e linhagens de feijoeiro (Figura 3.6 C).

A identificação de *Fusarium oxysporum* foi realizada através de métodos moleculares baseados na amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) e posterior sequenciação desta região. As sequências de DNA obtidas (Figura 3.6), foram comparadas com as depositadas no GenBank. Para tal utilizou-se o programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) com sequências depositadas na base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e foi possível identificar o fungo como sendo *Fusarium oxysporum*, obtendo-se uma similaridade de 99%.

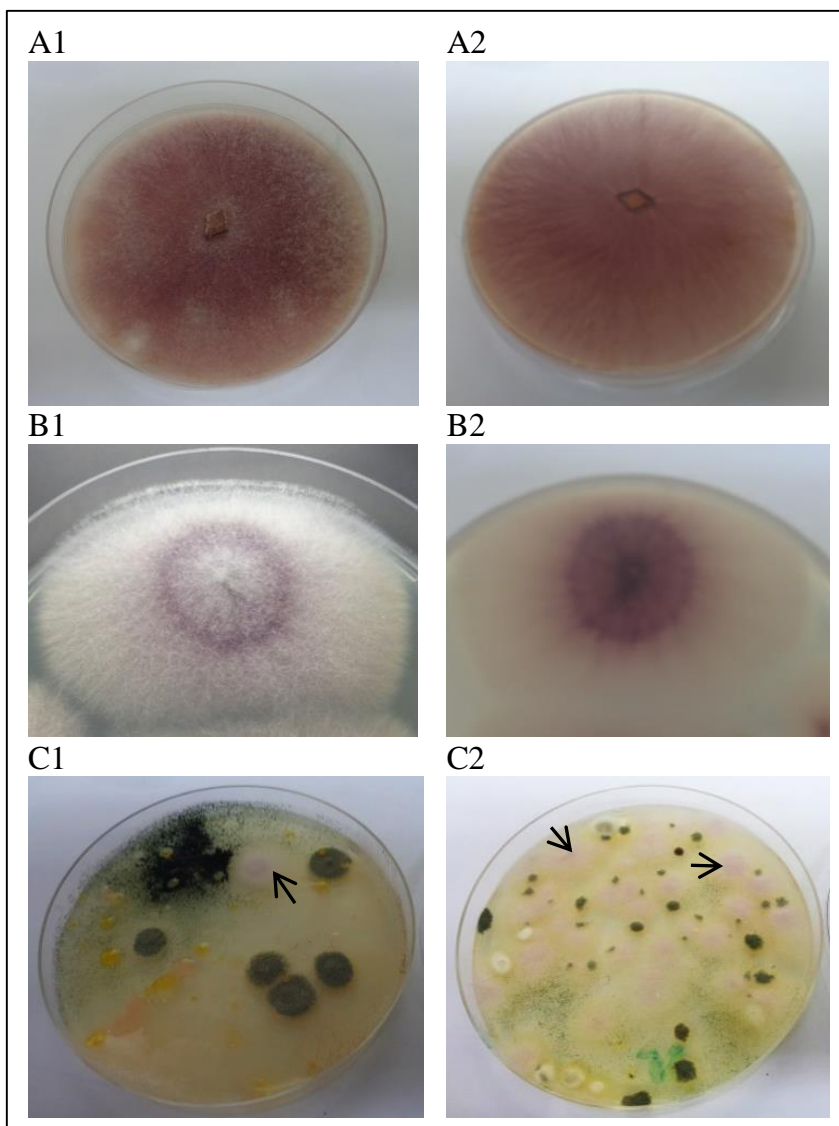


Figura 3.6 - Características das colônias e micélio de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp *phaseoli*. A1 e A2- Colônias purificadas obtidas no primeiro isolamento a partir de plantas da cv. “Oriente” em estufa comercial (frente e verso da placa). B1 e B2- Características de colônias e micélio de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp *phaseoli* re-isolado a partir de planta da linhagem X09, 21 dias após inoculação das raízes com a estirpe FA-15 (frente e verso da placa). C1 e C2- Aspetto de crescimentos microbianos obtidos em meio PDA, após isolamento a partir do substrato dos vasos com plantas inoculadas com a estirpe FA-15, 65 dias após inoculação das raízes. C1- pormenor de colônias de Fop isolada do substrato da linhagem X10; C2- Pormenor de colônias de Fop isolada do substrato da linhagem X80.

```

gggggaaccgaatttcactcccaacccctgtgacataccacttgtgcctcgcgcatcagcccgtcc
cggtaaacgggacggcccgccagaggaccctaaactctgtttctatatgtaacttctgagtaaacca
taaataaatcaaaactttcaacaacggatctcttggttctggcatcgatgaagaacgcagcaaatgcga
taagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgatctttgaacgcacattgcgcccgcagttatc
tggcgggcatgcctgttcgagcgtcatttcaaccctcaagcacagcttgggttgggactcgcgtaatt
cgcgttcctcaaattgattggcggtcacgtcgagcttccatagcgtagtagtaaaacccctggtactggt
aatcgtcgcgccacgccgttaaaccccaacttctgaatgttgacctcgatcaggttaggaataccgct
gaacttaagcatatcaaaagccggagggaagattccgcaggttcacctacggaaccgcgtttccctttg
tc

```

Figura 3.7 - Sequência de nucleótidos do DNA amplificado da região ITS do fungo.

3.2.3. Reação de linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

A inoculação de cultivares e linhagens de feijoeiro com a estirpe FA-15 foi realizada segundo a metodologia de corte e imersão de raízes numa suspensão de esporos do fungo, descrita na bibliografia para avaliação da resistência de linhagens de feijão rasteiro. A avaliação da reação das plantas testadas em condições controladas, efetuada 21, 30, e 40 dias após a inoculação (Figura 3.8 e 3.9) mostrou que não houve formação de sintomas típicos de doença, induzidas pelo fungo nas raízes inoculadas (F). Como seria de esperar, as plantas não-inoculadas (T), não apresentaram sintomas (Figura 3.8 e 3.9).

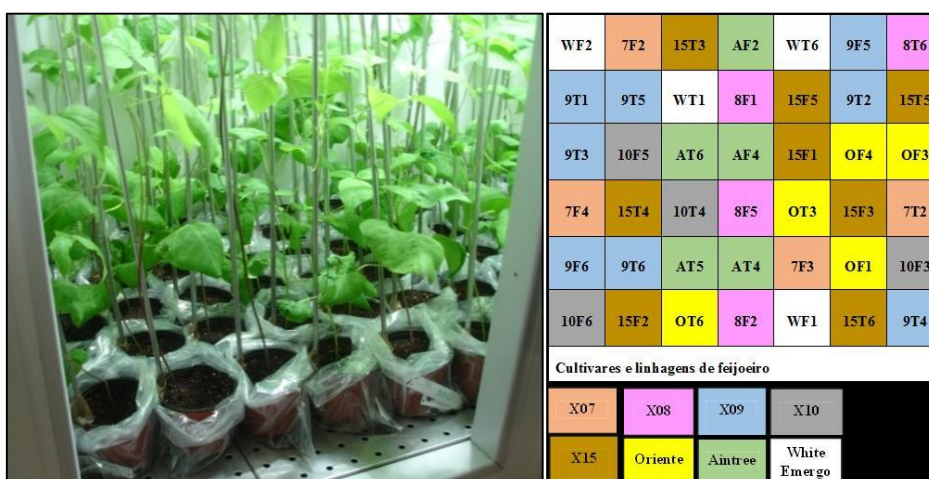


Figura 3.8 - Plantas observadas 15 dias após inoculação das raízes de plantas da cv. “Oriente”, “Aintree”, “White Emergo” e linhagens X07, X09, X10, X15 e X08 e plantas Testemunha não inoculadas. Pormenor da distribuição aleatória dos tratamentos, na camara de crescimento.



Figura 3.9 - Pormenor do desenvolvimento de plantas da cv. “Oriente”, “Aintree”, “White Emergo” e linhagens X07, X09, X10 e X15 X08 inoculadas com Fop e plantas Testemunha, observadas 21 dias após inoculação das raízes.



3.10 – Comparação do crescimento de feijão rasteiro e feijão de trepar, 21 dias após inoculação das raízes utilizando a metodologia descrita por Pastor-Corrales e Abawi (1987), onde é evidente a diferença de crescimento das plantas.

A aplicação da escala de severidade da doença (1- plantas sem sintomas a 9- plantas mortas) mostrou que todas as plantas inoculadas, bem como as testemunhas, foram classificadas com pontuação 1 (ausência total da doença). Assim, e de acordo com o proposto por vários autores (Pastor-Corrales e Abawi, 1987; Salgado e Schwartz, 1993; Elena e Papas, 2002; Pereira *et al.* 2008, 2013) todas as linhagens seriam resistentes à estirpe FA-15 inoculada.

As plantas de todas as cultivares e linhagens de feijoeiro (F e T) analisadas em laboratório 21 DAI, não revelaram qualquer sintoma interno, nomeadamente, necroses nos vasos.

Contudo, após isolamento a partir de material assintomático, obtiveram-se culturas típicas de Fop nas placas da linhagem X09 (Figura 3.6.B). Estes resultados indicam que o fungo colonizou as raízes e progrediu internamente no caule, sem contudo ter levado à manifestação de sintomas internos e externos.

Apesar do ensaio ter sido dado como terminado aos 40 DAI, as plantas foram deixadas na câmara de crescimento até ao início de setembro (60 DAI). A grande massa vegetal produzida pelo crescimento dos feijoeiros associada a temperatura e humidade favorável, favoreceu o ataque de ácaros e tripes, acabando as plantas por ficar muito debilitadas e algumas acabaram por morrer. Não sendo objetivo deste trabalho, procedeu-se ao isolamento do fungo a partir de algumas plantas que evidenciavam ligeiros sintomas da doença. Na mesma data, procedeu-se igualmente ao isolamento do fungo a partir do substrato de todas as linhagens inoculadas.

Os resultados obtidos mostraram que foi possível isolar o fungo de caules de feijoeiros das linhagens X08 e X15, o vem confirmar o já registado 21 DAI em plantas sem sintomas da linhagem X09. Ficou assim confirmada a patogenicidade da Estirpe FA-15 em feijoeiro.

O isolamento efetuado a partir do substrato onde cresceram plantas das cultivares “Oriente”, “White Emergo” e “Aintree”, e das linhagens de feijoeiro X07, X08, X09, X10 e X15, analisado 60 DAI, permitiu re-isolar o patógeno a partir do substrato (Figura 3.6 C), resultados que mostram que o fungo inoculado nas raízes colonizou o substrato, onde o fungo sobreviveu durante 60 dias.

4 – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Todas as linhagens de *Phaseolus coccineus* avaliadas quanto ao seu grau de resistência (DR) a *Meloidogyne javanica* foram consideradas hospedeiras suscetíveis de acordo com a classificação de Sasser et al. (1984), sofrendo danos nas suas raízes provocados pela infecção (GI superior a 2, Quadro 3.2), e permitindo a multiplicação da população de nemátodes (Rf superior a 1, Quadro 3.2).

No entanto, considerando a classificação proposta com base apenas nos valores do GI (Taylor e Sasser, 1978), a linhagem X09 destacou-se das restantes, suscetíveis, apresentando-se como moderadamente resistente. O GI é exclusivamente um indicador de danos à raiz, ou seja, é informativo apenas sobre a capacidade de penetração dos J2 e da sua capacidade de iniciação de locais de alimentação. Numa só galha podem, além disso, coexistir várias fêmeas de NGR, produzindo, cada uma, uma massa de ovos. Para avaliar a reação das plantas a NGR levando em conta não só a penetração da raiz mas também o desenvolvimento do nemátode e a sua capacidade de completar o seu ciclo de vida, será mais indicada a classificação de resistência através do EI (Hadisoeganda e Sasser, 1982). A análise dos valores médios de EI obtidos para as várias linhagens permite uma maior diferenciação da sua capacidade hospedeira: a linhagem X09 foi moderadamente resistente, a X15 pouco resistente, a X08 e a X10 foram suscetíveis.

Tanto o GI como o EI são índices que denotam a quantidade de galhas e de massas de ovos (respetivamente) de uma forma não-regular e com um valor de corte de 100 (veja-se o Quadro 2.1). Assim, independentemente da extensão ou volume do sistema radicular ou do número de galhas ou massas de ovos, para qualquer planta com mais de 100 obtém-se o valor de GI ou EI de 5. Esta escala é prática, rápida e fácil de utilizar para ensaios de resistência de plantas hortícolas em condições controladas, seguindo o protocolo-padrão de Taylor e Sasser (1978). No entanto, para uma análise mais aprofundada e comparativa de várias linhagens, acompanhada de uma análise estatística robusta, será preferível analisar os valores quantitativos de galhas e massas de ovos (Fig. 3.4 A e B). Desta se depreende que a linhagem X09, moderadamente resistente de acordo com a classificação de resistência do GI, não formou um número de galhas significativamente menor do que as linhagens X08 e X15. Além disso, a linhagem X15, pouco resistente de acordo com a classificação de resistência do EI, não produziu significativamente menos massas de ovos que as linhagens X08 e X10. Em termos quantitativos, a linhagem X09 só se destaca pelos dados de reprodução do

nemátode (número de massas de ovos e fator de reprodução), e não dos danos causados na raiz.

Embora haja estudos da reação de numerosas cultivares e/ou linhagens de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* a várias espécies de *Meloidogyne*, não foram encontrados quaisquer estudos em relação a *P. coccineus*. No entanto, o Rf de *M. javanica* obtido para esta linhagem é comparável com o Rf obtido para *M. incognita* na cultivar resistente Aporé (Rf = 1.83, Alves et al., 2011). Esta cultivar de *P. vulgaris* tem uma resistência de base genética relativamente bem caracterizada, conferida por um só gene, mas possivelmente modulada por vários outros (Ferreira et al. 2012).

Da análise do Rf percebe-se que a linhagem X10 foi a que permitiu uma maior aumento populacional do nemátode (cerca de 17 vezes, Quadro 3.2), que no entanto não foi significativamente diferente do valor obtido para as linhagens X08 e X15 (Figura 3.4 C). Este valor médio para a linhagem X10 aproximou-se bastante do valor obtido para a mesma população de nemátodes infectando tomateiros de cultivares manifestamente suscetíveis (testemunhas positivas). No entanto, foi escolhido o valor de Rf padrão da linhagem X10 para o cálculo do RI (e não do tomateiro), uma vez que será sempre aconselhável escolher o Rf padrão de uma planta da mesma espécie das analisadas (Taylor e Sasser, 1978). Nos estudos de reação hospedeira de plantas a NGR deverá ser sempre incluída uma cultivar suscetível de referência para a espécie. Embora seja já conhecida a reação de várias cultivares de *Phaseolus vulgaris* a *Meloidogyne* spp., não se conhecia na altura do estudo a reação da espécie *P. coccineus*.

O efeito da inoculação de 5000 ovos e J2 do nemátode por planta foi evidenciado pela redução estatisticamente significativa do peso fresco da parte aérea para o conjunto das plantas inoculadas. Esta redução no peso fresco, não observada para o peso seco correspondente poderá revelar um sintoma da infeção por NGR, que se sabe afeta a eficiência do uso da água pelas plantas hospedeiras, através da alteração da fisiologia da raiz. Houve ainda uma tendência para um menor peso fresco na parte radicular nas plantas inoculadas, que não se verificou, no entanto para a linhagem X10. De facto, a formação de numerosas galhas radiculares com correspondente translocação de fotoassimilados para as células gigantes poderá ter sido responsável pelo aumento relativo do peso fresco radicular para a linhagem X10, que registou o número médio de galhas nas raízes mais elevado de todas as

linhagens (Fig. 3.4.A). Este aumento do peso radicular para níveis elevados de infecção por NGR foi já reportado para *P. vulgaris*, entre outras plantas (Santo e Ponti, 1985).

As condições controladas e o período de duração do ensaio de vasos (60 dias) são aferidos em função do ciclo de vida *M. javanica* e, sendo suficiente para a o desenvolvimento e produção de ovos pelas fêmeas adultas, não deverá permitir o início de um segundo ciclo do nemátode. Assim, este tipo de ensaio não fornece qualquer informação sobre a produção das plantas. No entanto, uma revisão recente da bibliografia para várias espécies de NGR na Europa aponta para um elevado potencial de danos desta espécie de NGR em feijoeiro *P. vulgaris* (Wesemael et al., 2011). A duração fixa do ensaio também não permite avaliar o mecanismo de resistência de feijoeiro aos NGR, mas é conhecido que linhagens resistentes de feijoeiro *P. vulgaris* podem atuar não só pela inibição da infecção, mas também atrasando o desenvolvimento de NGR: este efeito foi observado para o desenvolvimento de *M. incognita* na cultivar resistente Nemasnap por comparação a uma cultivar suscetível Black valentine (Sydenham et al. 1996).

Do ensaio de reação de *P. coccineus* a *M. javanica* conclui-se que, entre as linhagens avaliadas, a X09 será a mais promissora na busca de porta-enxertos de feijoeiro. Embora não seja uma linhagem completamente resistente, poderá ter potencial genético útil para a resistência a NGR, que poderá ser mais bem explorado por melhoramento.

Sendo a defesa das plantas um mecanismo complexo que envolve comunicação entre a parte aérea e a parte radicular, seria expectável que uma planta enxertada pudesse ter fenótipos de resistência variáveis em função não só do porta-enxerto mas também do enxerto. No entanto, a resistência numa planta enxertada será conferida pela parte radicular, conforme demonstrado num estudo com várias combinações de *P. vulgaris* suscetível a *M. incognita* (cultivar Canario Divex), uma linhagem resistente (A211) e uma cultivar resistente (Nemasnap) (Mullin et al., 1991). Este facto, juntamente com o conhecimento empírico que a proximidade botânica é um factor importante na compatibilidade entre o enxerto e o porta-enxerto, vem reforçar a possível aplicação da linhagem X09 ou de uma linhagem melhorada a partir desta como porta-enxerto de feijoeiro.

Este trabalho foi desenvolvido utilizando uma população bem caracterizada e estudada de *M. javanica*, uma das quatro espécies mais importantes do género pelos danos que provoca e pela sua distribuição, e uma das mais prevalentes no sul da Europa. Sendo polífaga e reproduzindo-se por partenogénese mitótica, é uma espécie que se multiplica rapidamente

numa vasta gama de hospedeiros. No entanto, haverá pelo menos 23 espécies do género na Europa, sendo *M. arenaria* e *M. incognita* prevalentes também no sul da Europa (Wesemael et al., 2011). Antes de serem efectuados estudos de campo com qualquer linhagem, importa conhecer a sua reacção a várias espécies de *Meloidogyne*, uma vez que uma dada cultivar de feijoeiro poderá ter uma reacção distinta a diferentes espécies de NGR. Por exemplo, *M. chitwoodi* teve um aumento populacional nas cultivares de *P. vulgaris* Pinto UI-114 e Viva Pink, enquanto que *M. hapla* não se reproduziu nestas plantas (Santo e Ponti, 1985). De modo semelhante, em 10 cultivares de *P. vulgaris* testadas, o número de massas de ovos produzidas por sistema radicular variou significativamente consoante a espécie de NGR inoculada: *M. chitwoodi*, *M. fallax* ou *M. hapla* (Wesemael et al 2012). No entanto, sabe-se que um mesmo gene pode conferir resistência em *P. vulgaris* a pelo menos três espécies diferentes de NGR: *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* (Omwega et al 1990).

Em condições de campo, além das variáveis e por vezes adversas condições abióticas, as plantas estão frequentemente expostas a mais que um agente patogénico. Embora não se conheçam estudos realizados para *P. coccineus*, a interacção de NGR com *Fusarium oxysporum* f sp. *phaseoli* (Fop) tem sido investigada para *P. vulgaris*. Através de ensaios de vasos com todas as combinações de linhagens de feijoeiro suscetíveis ou resistentes a Fop e a NGR e inoculadas com estes agentes patogénicos isoladamente ou em combinação, concluiu-se que a pré-inoculação de *M. incognita* pode aumentar a suscetibilidade a Fop, podendo inclusive acelerar o processo de colonização das plantas suscetíveis a Fop. Uma infeção severa por *M. incognita* teve a capacidade, aliás, de alterar a resistência de uma dada cultivar a Fop (France and Abawi, 1994). Embora empiricamente se sugira que plantas suscetíveis a Fop serão também suscetíveis a NGR, surgindo os dois agentes patogénicos frequentemente associados em complexos de doença, tal não foi ainda comprovado. Por outro lado, da análise de ensaios de vasos com 18 linhagens de *P. vulgaris* não foi encontrada uma correlação significativa entre a resistência a Fop e a resistência a NGR (Carneiro et al., 2010).

São necessários mais estudos para avaliar e caracterizar a resistência de potenciais porta-enxertos de feijoeiro em ensaios laboratoriais, de vasos e em condições de campo, com plantas porta-enxerto e com plantas enxertadas.

Todas as linhagens de *Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus coccineus* avaliadas quanto à severidade da doença, utilizando a escala padrão proposta por Pastor-Corrales e Abawi (1987), não manifestaram sintomas da doença durante 40 dias após inoculação das raízes. De acordo com a classificação utilizada por Salgado e Schwartz (1993), Elena e Papas (2002), Pereira *et al.*, (2013) e Sasser *et al.* (1984) as linhagens em estudo foram consideradas resistentes a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. Esta escala é prática, rápida e fácil de utilizar para ensaios de resistência de feijoeiro a Fop em condições controladas, mas foi desenvolvida para cultivares de feijoeiro rasteiro, para produção de grão.

Uma boa metodologia de avaliação da reação de linhagens a agentes patogênicos é aquela que possibilita discriminar bem todos os genótipos em avaliação. Isso não ocorreu neste trabalho, pois a aplicação da escala de severidade da doença (1- plantas sem sintomas a 9- plantas mortas) mostrou que todas as plantas inoculadas e as plantas testemunhas, foram classificadas com pontuação 1 (ausência total da doença), e portanto todas resistentes à estirpe de *Fusarium* inoculada. Estes resultados, contrariam o que foi observado em condições de produção comercial de feijão-verde, nomeadamente na cultivar “Oriente” (testemunha de suscetibilidade a Fop), que apresentou graves sintomas da doença (Figura 3.5), e a partir da qual se isolou a estirpe FA-15 usada neste estudo.

O fato de não existir neste ensaio uma cultivar testemunha com conhecida resistência a Fop, evidencia a necessidade de se incluir neste tipo de avaliações, duas cultivares testemunha, com suscetibilidade e resistência conhecidas às estirpes do patógeno em estudo, tal como é referido por Pereira *et al.* (2008). Estes autores referem que a inclusão da cultivar resistente, ‘Carioca MG’ e suscetível, ‘Carioca’, permitiu validar as respostas de grande número de linhagens de feijão rasteiro, avaliadas em ensaios diferentes, uma vez que estas cultivares mostraram comportamento consistente nos diferentes ensaios.

Para a avaliação de cultivares e linhagens quanto à resistência a Fop, é importante ter um método de inoculação preciso e funcional. Pastor-Corrales e Abawi (1987) referem que a concentração de inoculo tem importante influência na doença causada por *Fusarium*, uma vez que há relação direta entre a concentração do inóculo e a severidade da doença. Buruchara e Camacho (2000) determinaram a concentração de inóculo considerando o hábito de crescimento das cultivares, tendo verificado que a concentração de inóculo influenciou o aparecimento de sintomas, a severidade e a incidência da doença. Os autores concluíram que concentrações de 10^4 - 10^7 conídios ml^{-1} , para feijoeiros trepadores e

concentrações de 10^5 - 10^7 conídios ml^{-1} , para feijoeiros arbustivos, não apresentaram diferenças estatísticas entre os resultados obtidos, indicando que concentrações dentro desses intervalos são eficientes para discriminar a reação das cultivares. De acordo com estes dados, concluímos que a concentração da suspensão de conídios utilizada no presente ensaio (10^6 conídios ml^{-1}) foi adequada, e deveria ter originado sintomas da doença, pelo menos na cultivar suscetível “Oriente”.

Os mesmos autores avaliaram métodos de inoculação e datas de observação dos sintomas (15, 20, 25 e 30 dias após inoculação). As metodologias incluíram a perfuração do solo à volta da planta e deposição de 20 ml de suspensão de conídios, e imersão de raízes numa suspensão de 10^6 conídios ml^{-1} durante 5 minutos. Este último método apresentou maior eficácia na avaliação da resistência, e o melhor período para realização das observações foi 30 DAI. Estudos idênticos conduzidos por Pereira (2007), em 20 linhagens de feijoeiro mostraram que a metodologia de inoculação que melhor discriminou as linhagens foi a imersão de raízes na suspensão de esporos, com ou sem o corte do sistema radicular, a idade ideal das plantas no momento da inoculação é até os 10 dias após a sementeira; a avaliação da reação ao fungo deve, segundo este autor, deve ser realizada, pelo menos, 21 dias após a inoculação. Outros autores (Piza, 1993; Cavalcanti *et al.*, 2002) referem a ocorrência de sintomas mais cedo, nomeadamente 15 DAI. Os resultados dos diferentes autores não são concordantes quanto à data de observação dos sintomas, o que vem reforçar os dados do presente estudo quanto a este parâmetro da metodologia. Efetivamente, 40 DAI não foi suficiente para que as populações do fungo atingissem concentrações no caule para colonizar e bloquear os vasos xilémicos, não originando assim o aparecimento de sintomas. No entanto, a inoculação das raízes com uma suspensão de 10^6 conídios ml^{-1} permitiu que se isolasse o fungo de plantas assintomáticas da linhagem X09, e mostrou que Fop tem capacidade de colonizar o substrato, mantendo-se viável por um período de 60 dias.

O crescimento de plantas de feijão rasteiro (Pastor-Corrales e Abawi (1987) e de feijão de trepar, 21 dias após inoculação das raízes, é evidenciada na figura 3.10, sendo observável uma grande diferença de crescimento vegetativo das plantas das duas espécies. Esta diferença, e a ausência de sintomas registadas no presente estudo leva-nos a questionar sobre a data mais adequada para observação de sintomas nas cultivares de trepar. Considerando as condições em que se observou a doença no campo (produção comercial da cultivar “Oriente”), podemos concluir que os sintomas da fusariose em feijão de trepar são evidentes

na fase de plena floração e vingamento dos frutos, o que ocorre naturalmente quando as plantas têm mais de que 21 ou mesmo 30 dias. Os testes padrão utilizados pela maioria dos autores que avaliam a resistência de linhagens de feijão rasteiro ao *Fusarium* em condições controladas, é de 21 DAI. Pelo exposto, somos levados a concluir que as observações dos sintomas em feijão de trepar, sob condições controladas, deveriam ocorrer mais tarde, quando as plantas estão em plena floração.

O número de repetições adotado pelos investigadores que trabalham na identificação de linhagens resistentes a *Fusarium*, tem sido muito variado. A maioria utiliza mais de 16 plantas para avaliação (Nascimento et al., 1995b; Buruchara e Camacho, 2000; Alves-Santos et al., 2002). Pereira et al. (2008) estudando diferentes números de repetições, variando entre 5 e 15, concluíram que se podem utilizar 5 repetições (plantas), sem prejuízo na precisão e na classificação das linhagens. Também este ponto da metodologia é concordante com o presente estudo, em que se utilizaram 6 repetições por tratamento.

Por fim, questionamos se no nosso estudo o tempo de imersão das raízes durante 5 minutos foi adequado às linhagens de feijoeiro de trepar, que têm sistemas radiculares mais vigorosos do que os de feijão rasteiro, para a mesma idade das plantas. Sobre este assunto, há várias opiniões, sendo referidos para feijão rasteiro, tempos de imersão de 5 minutos (Pastor-Corrales e Abawi, 1987, Pereira et al., 2008), 10 minutos (Henrique et al., 2015) e 30 minutos (Elena e Pappas, 2002), o que não nos permite concluir sobre este ponto da metodologia.

As estirpes patogénicas de *F. oxysporum*, apresentam um elevado grau de especificidade no hospedeiro que infetam, estando subdivididas em mais de 100 formas patogénicas especializadas (*formae speciales*) que não se distinguem morfológicamente. As *formae speciales* pode ainda ser subdividida em raças com base no padrão de virulência nas cultivares do hospedeiro infetados (Armstrong et al., 1981). *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* infeta algumas espécies do género *Phaseolus*, principalmente *Phaseolus vulgaris* e *P. coccineus* (de Vega-Bartol et al., 2011) estando descritas sete raças, que traduzem a variabilidade genética do patógeno.

Este aspeto é da máxima relevância pois a principal medida de controlo de Fop é a utilização de cultivares resistentes cuja obtenção é dificultada pela existência de sete raças patogénicas de Fop, as quais estão geograficamente distribuídas entre os continentes.

Atualmente não estão disponíveis cultivares comerciais de feijão com resistência a Fop, que possam ser utilizados como porta enxertos. Para que a enxertia possa ser utilizada como uma estratégia eficaz para controlar a fusariose vascular do feijoeiro, e dado que as raças de Fop são geograficamente bem definidas, é determinante conhecer a (s) raça (s) de Fop presentes em Portugal, de modo a estabelecer um programa de seleção de linhagens de porta-enxertos com resistência às raças mais importantes identificadas em Portugal. O grande objetivo é reduzir os prejuízos causados por Fop na cultura do feijoeiro utilizando porta-enxertos resistentes.

Conclui-se da necessidade de realizar novos ensaios para adaptar as metodologias utilizadas em feijão rasteiro à avaliação de resistência de feijão de trepar, nomeadamente a concentração do inóculo, o tempo de inoculação, o momento ideal para avaliação da reação das linhagens e o conhecimento das raças de *Fusarium* mais importantes em Portugal. Pretende-se determinar a maior eficácia do procedimento de *screening* de linhagens de feijoeiro em programas de seleção visando a resistência de porta enxertos a *F. o. f.sp. phaseoli*.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abawi, G. S., 1989. Root rots. Bean production problems in the tropics, Eds. Schwartz, H., F.; Pastor-Corrales, M. A. Cali, CIAT, 105-157.
- Abawi, G. S.; Pastor-Corrales, M. A., 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research Methodologies, and Management Strategies. CIAT Publication No. 35, Cali, Colombia. 114pp.
- Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W.; Blackwell, M., 1996. Introductory Mycology. John Wiley e Sons, New York, 4Ed, 869pp.
- Almeida, D., 2006. Feijão-verde e outros Phaseolus. *Manual de Culturas Hortícola*. Lisboa: Editorial Presença. Vol. II, 247-270.
- Alves, F. R.; Santos, L. N. S.; Moraes, W. B.; Cosmi, F. C.; Cabral, P. D. S.; Filho, S. M.; Matta, F. P.; Júnior, W. C. J., 2011. Reaction of common bean genotypes to *Meloidogyne incognita* Race 1. V.29, N°2, IDESIA, Chile, 95-98.
- Alves-Santos, F. M; Cordeiro-Rodrigues, L.; Sayagués, J. M.; Martín-Dominguez, R; García-Benavides, P.; Díaz-Mínguez, J. M.; Eslava, A.P., 2002. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. Plant Pathology, 51:605-611.
- Andrews, P.; Marques, C., 1994. Graft incompatibility. Janick, J. Horticultural Reviews, v. 15, Purdue University, 183-232.
- Armstrong G M, Armstrong J K., 1981. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: Nelson P E, Toussoun T A, Cook R, editors. *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. University Park: The Pennsylvania State University Press. pp. 391–399.
- Beckman, C. H., 1987. The nature of with diseases of plants. St. Paul: APS Press, 175pp.
- Bianchini, A.; Maringoni, A.C.; Carneiro, S.M.T.P.G, 1997. Doenças do feijoeiro. *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Agronomica Ceres, V.2, 376-399.
- Bird, D McK, Opperman C. H., 1998. *Caenorhabditis elegans*: A Genetic Guide to Parasitic Nematode Biology. Journal of Nematology 30, 299-308.
- Booth, C., 1971. The genus *Fusarium*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 237pp.
- Brandão, J., Goto, R., Guimarães, V., Habermann, G., Rodrigues, J., Callegari, O., 2003. *Influência da enxertia nas trocas gasosas de dois híbridos de berinjela cultivados em ambiente protegido*. Horticultura Brasileira, Brasília, v.21, n. 3, 474-477.
- Bruinsma, J. S., 2013. *Avaliação de métodos para o estudo da resistência de genótipos de soja a Meloidogyne javanica (Treub) Chitwood*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciencias Naturais e exatas, Santa Maria, Brasil, 59pp.
- Byrd, D. W.; Kirkpatrick, T.; Barker, K. R., 1983. Na improved technique for clearing and staining plant tissue for detection of nematodes. Journal of Nematology 15, 142-143.

- Campos, F. G., 2012. *Bioconcentração do urânio em duas variedades de Feijó (*Phaseolus vulgaris* L.) e respectivas consequências ambientais*. Tese de Mestrado, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 72pp.
- Carneiro, F. F.; Ramalho, M. A. P.; Pereira, M. J. Z., 2010. *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* and *Meloidogyne incognita* interaction in common bean. Brazilian Society of Plant Breeding, Printed in Brazil, Crop Breeding and Applied Biotechnology 10, 271-274.
- Castagnone-Sereno P, Danchin E. G. J., 2014. Parasitic success without sex: the nematode experience. *Journal of Evolutionary Biology* 27, 1323-1333.
- Chitarra, M. I.; Chitarra, A. B., 2005. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseamento lavras, UFLA, 785pp.
- Cichy, K. A., Snapp, S. S., Kirk, W. W., 2007. *Fusarium* root rot incidence and root system architecture in grafted common bean lines. *Plant Soil*, 233-244.
- Cofcewicz, E.T.; Medeiros, C.A.B; Carneiro, R.M.D.G; Pierobom, C.R., 2001. Interação dos fungos micorrízicos arbusculares *Glomus Etunicatum* e *Gigaspora margarita* e o nematóide das galhas *Meloidogyne javanica* em tomateiro. *Fitopatologia brasileira*, Brasília, V.26, 65-70.
- Cordeiro, Z.J.M.; Matos, A.P., 2003. Doenças da bananeira. Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial, Eds. Freire, F.C.; Cardoso, J.E.; Viana, F.M.P. Brasília, DF. Embrapa informação tecnológica, 323-390.
- Costa, M.J.N; Campos, V.P.; Pfenning, L.H; Oliveira, D.F., 2000. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com Aplicação de Filtrados Fúngicos ou Extratos de Plantas e de Esterco Animais. *Nematologia Brasileira*, Brasília, V.24, 219-226.
- Costa, S. R.; Davies, K. G.; Bardgett, R. D.; Kerry, B. R., 2012. Ecology of nematode microbial enemies in coastal sand dunes. *Oecologia* 170, 1053-1066.
- Costa, S. R., 2014. Ecologia de nemátodes e seu interesse na enxertia de plantas hortícolas I/II. *AGROTEC*, 38-41.
- Costa, S R., 2015. Ecologia de nemátodes e seu interesse na enxertia de plantas hortícolas II/II. *AGROTEC*, 28-30.
- Costa S. R., van der Putten WH, Kerry, B. R., 2011. Microbial Ecology and Nematode Control in Natural Ecosystems. In Davies Spiegel Eds. *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Nematology*. Progress in Biological Control Springer.
- Davis, A. R.; Perkins, P., Hassell, R.; Levi, A.; King, S. R.; Zhang, X., 2008. Grafting Effects on Vegetable Quality. *HortScience*, 1670-1672.
- Debouck, D.G.; Toro, O.; Paredes, O.M.; Johnson, W.C.; Gepts, P., 1993. *Genetic diversity and ecological distribution of Phaseolus vulgaris (fabaceae) in northwestern south america*. *Econ. Bot.*, 47, 408-423.
- De Vega-Bartol, J. J, Martín-Dominguez, R, Ramos, B, García-Sánchez, M.A, Díaz-Mínguez, J. M., 2011. New Virulence Groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: the expression of the gene coding for the transcription factor *ftf1* correlates with virulence. *Phytopathology* , 101, 470 – 479.

- Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., e Roncero, M. G., 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. Mol. Plant Pathol. 4:315-325.
- Dourado N, D.; Fancelli, A.L., 2000. *Produção de feijão*. Guaíba: Agropecuária, 385pp.
- Doorenbos J.; Kassam A.H., 1994. *Efeito da água no rendimento das culturas*. Campina Grande: UFPB, 218pp.
- Elena, K.; Papas A. C., 2002. Pathogenicity and vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in Greece. Journal of Phytopathology 150, 495-499.
- Ellis, D., 2015. Micology on line. The University of Adelaide. [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Fusarium/oxysporum.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Fusarium/oxysporum.html), consultado em 24 de Novembro de 2015
- Embrapa, 2010. Tecnologias de produção de soja região central do Brasil 2011. Londrina: Embrapa soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuaria Oeste, 255pp.
- Fachinello, J.; Hoffmann, A.; Nachtigal, A.; Kersten, E.; Fortes, G., 1995. *Propagação de plantas frutíferas de clima temperado*. 2.ed. Pelotas: UFPEL.
- Fancelli, A. L., 2003. Influência da nutrição de planta na ocorrência de doenças e pragas. In *Feijão irrigado: tecnologia e produtividade*, Eds. Fancelli, A.L.; Dourado N, D. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Produção Vegetal.
- Ferraz, L. C. C. B., 2001. As meloidogynoses da soja: passado, presente e futuro. In *Relações parasito-hospedeiro nas meloidogynoses da soja*, Eds. Ferraz, L. C. C. B.; Asmus, G. L.; Carneiro, R. G.; Mazaffera, P.; Silva, J. F. V. Londrina: Embrapa Soja.
- Ferreira, S.; Antonio, L.; Gomes, A.; Maluf, W. R.; Furtini, I. V.; Campos, V. P., 2012. Genetic control of resistance to *Meloidogyne incognita* race 1 in the Brazilian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Aporé. Euphytica, 186, 867-873.
- FLF, 2010. Frutas Legumes Flores. Plantas enxertadas relançam feijão no solo, 82pp.
- France, R. A.; Abawi, G. S., 1994. Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on Selected Bean Genotypes. Journal of Nematology, 26, 467-474
- Gardé A.; Gardé, N, 1988. Culturas hortícolas, 6ªed Porto: Clássica Editora
- Ghini, R., Patricio; F. R. A.; Souza, M. D.; Sinigaglia, C.; Barros, B. C.; Lopes, M. E. B. M.; Tessarioli, J. N.; Cantarella, H., 2003. Efeito da solarização sobre propriedades físicas, químicas e biológicas de solos. R. Bras, Ci. Solo, 27, 71-79.
- González, J., 1999. *Planteles: semilleros, viveros*. Reus: Ediciones de Horticultura. Cap.9, 121-128.
- Grisi, M.C., 2006. Mapeamento genético baseado em marcadores microssatélites em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) utilizando a população referência (bat 93 x jalo eep558). Dissertação (mestrado em biologia).
- Gurusamy, K. E. B., Vandenberg, A., 2009. Grafting as a tool common bean breeding. Department of Plant Sciences, University of Saskatchewan, Canada, 51pp.
- Hadisoeganda, W. W., Sasser, J. N., 1982. Resistance of tomato, bean, Southern pea, and garden pea cultivars to root-knot based on host suitability. Plant Disease 6, 145-150.

- Hartmann, H.T.; Kester, D.E., 1995. *Propagación de plantas*. 4ed. México: Compañía Editorial Continental, 760pp.
- Hartman, K., 1983. Enhancement technique for egg masses of the root-knot nematode with phloxine B, p.130. In Proc. Third Res. & Plann. Conf. On Root-knot Nematodes, *Meloidogyne* spp., March 22-26, 1982, ed Carter, C. C., International Meloidogyne Project, Lima, Peru, 233pp.
- Henrique, F. H., 2012. *Melhoramento do feijoeiro para resistência ao Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli: identificação de raças e introgressão de resistência*. Tese de Mestrado, Instituto Agronômico, Campinas SP, Brasil, 55pp.
- Henrique, F. U., Carbonell, S. A. M., Ito, M. F., Gonçalves, J. G. R., Sasserón, G. R., Chiorato, A. F., 2015. Classification of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common bean Bragantia, Campinas, 74, n.1, 84-92.
- INE, 2015. *Estatísticas Agrícolas 2014*. Instituto Nacional de Estatística, 170pp.
- ISF (2014). Recommended codes for Pest Organisms in Cereal and Vegetable Crops, 15 pp. <https://www.siegers.com/pdfs/RecommendedCodes.pdf> , consultado em 24 de Novembro de 2015.
- Ito, M. A., 2004. *Patogenicidade de Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli, adubação nitrogenada e produtividade de feijão*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Brasil, 61pp.
- Jones J. T., Haegeman A, Danchin E. G., Gaur H. S., Helder J, Jones M. G., Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius J. E., Wesemael W. M., Perry R. N., 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14, 946-961.
- Lee, J. M.; Kubota, C.; Tsao, S.; Bie, Z.; Echevarria, P. H.; Morra, L., 2010. Current status of vegetable grafting: Diffusion, grafting techniques, automation. *Scientia Horticulturae*, 93-105.
- Leslie, JF & Summerell, BA. 2006. *The Fusarium laboratory, Manual*. Blackwell Publishing, 209 pp.
- Lopes, C. A.; Mendonça, J. L., 2014. *Enxertia em tomateiro para o controle da murcha-bacteriana*. Circular Técnica, 131, Brasília, 8pp.
- Lugo, L. S. C., 2008. *Manejo biorracional de la pudrición de la corona y raíz (Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopercisi) del tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Tese de Mestrado, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, Departamento Agropecuario, Guasave, Sinaloa, México, 79pp.
- Mace, M. E.; Bell, A. A.; Beckman, C. H., 1981. *Fungal wilt diseases of plants*. New York, Academic Press, 640pp.
- Maroto, J. V., 1989. *Horticultura herbácea especial*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 566pp.
- Marques, A.; Opitz, L.; Afonso, M.; Leite, E. L.; Pacheco, J. P.; Sousa, P.; Pacheco, R., s/d. *Horticultura Manual do Formando*. ECTEP, Lda, 365pp.

- Martínez, B. M. C.; Alcaraz-López, C.; Muries, B.; Mota-Cadenas, C.; Carvajal, M., 2010. Physiological aspects of rootstock-scion interactions. *Scientia Horticulturae*, 112-118.
- Menezes, J.R.; Mohan, S. K.; Bianchini, A.; Souza, G. L, 1981. *Qualidade sanitária de sementes de feijão (Phaseolus vulgaris L.) no Estado do Paraná*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.6, 497-508.
- Michielse, C. B., and Rep, M., 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Mol. Plant Pathol. 10, 311–324
- Moens, P., 2006. *Plant Nematology*. Eds. Roland. M.M; Perry. N. Londres: Cabi.
- Mohan, S. K.; Bianchini, A.; Menezes, R. J, 1983. Doenças do feijoeiro no Estado do Paraná: Guia para identificação e controle. Londrina: IAPAR, 26pp.
- Moura, M. L. R. M., 1993. Solarização do solo em estufa na região de entre Douro e Minho: Ação sobre patógenos do solo e efeitos na produção de culturas hortícolas. Tese de Mestrado, ISA/UTL, 137pp.
- Mourão, I. M., e Brito, L. M., 2014. A Enxertia em Culturas Hortícolas. *AGROTEC*, 3º Trimestre, 52-56.
- Mullin, B. A.; Abawi, G. S.; Pastor-Corrales, M. A.; Kornegay, J. L., 1991. Contribution of Root and Shoot Tissues of *Phaseolus vulgaris* to *Meloidogyne incognita* Resistance. HortScience 26, 1503-1504.
- Mumba, L.E. Galwey, N.W., 1999. Compatibility between wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes of the mesoamerican and andean gene pools: Evidence from the inheritance of quantitative characters. Euphytica, 108, 105-119.
- Neergard, P., 1979. *Seed pathology*. London, MacMillan, v.1, 839pp.
- Nelson, P. E.; Toussoun, T. A.; Marasas, W. F. O., 1993. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press.
- Nicol, J. M., Turner S. J., Coyne D. L., den Nijs L, Hockland S, Tahna Maafi Z., 2011. Current Nematode Threats to World Agriculture in: Jones et al Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Springer.
- Niño-Sánchez J, Tello V, Casado-del Castillo V, Thon MR, Benito EP e Díaz-Mínguez JM 2015. Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Front. Microbiol.* 6:234.
- Oda, M., 1995. New grafting methods for fruit bearing vegetables in Japan. JARQ (Jpn. Agric. Res. Q) (Yatabe), v.29, 94 – 187.
- Omwega, C. O.; Thomason, I. J.; Roberts, P. A.; 1990. A Single Dominant Gene in Common Bean Conferring Resistance to Three Root-Knot Nematode Species. Department of Nematology, University of California, v.8, n.8, 745-748.
- Pastor- Corrales M. A, Abawi G. S., 1987. Reactions of selected bean germplasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Plant Dis. 71, 990 – 993.
- Peil, R. M, 2003. *A enxertia na produção de mudas de hortaliças*. Ciência Rural, Santa Maria, Brasil, v. 33, n. 6, 1169-1177.

- Pereira, A. C., Cruz, M. F. A.; Júnior, T. J. P.; Rodrigues, F. A.; Carneiro, J. E. S.; Vieira, R. F.; Carneiro, P. C. S., 2013. Infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on resistant, intermediate and susceptible bean cultivars. *Tropical Plant Pathology*, v.38, n.4, 323-328.
- Pereira, M. J. Z., 2007. *Resistência do feijoeiro a Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 103pp.
- Pereira, M. J. Z.; Ramalho, M. A. P.; Abreu, A. F. B., 2008. Estratégias para eficiência da seleção de feijoeiro quanto à resistência à murcha-de-fusário. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43, 721-728.
- Pires, C.V.; Oliveira, M.A.G.; Cruz, G.A.D.R.; Mendes, F.Q.; Rezende, S.T.; Moreira, M.A., 2005. Physicochemical composition of different cultivars of beans (*phaseolus vulgaris* L.). *Alimentação e nutrição*, 16, 157-162.
- Polhill, R.M.; Raven, P.H.; Stirton, C.H., 1981. Evolution and systematics of the *leguminosae*. *Advances in legume systematics*. Royal botanic gardens, 1-26.
- Reis, A.; Oliveira, S.M.A.; Menezes, M; Mariano, R.L.P, 1995. *Potencial de isolados de Trichoderma para o biocontrole da murcha de Fusarium de feijoeiro*. *Summa Phytopathologica*, v.21, n.1.
- Ritzinger, C. H. S. P.; Costa, D.C., s/d. Nematóides e Alternativas de manejo. 183–194.
- Ripado M. F.B, 1992. *O Feijão: Variedades, Cultura, Produção*. Europa-América, 135pp.
- Rocha, S. F., 2007. *Aspectos da coloração, ciclo de vida, parasitismo por pasteuria penetrans e suas relações com a reserva energética de juvenis do segundo estágio de Meloidogyne spp.* Universidade Federal de Lavras. Tese de Doutorado em Agronomia, área de Fitopatologia, Lavras, 148pp.
- Rodrigues, C., 2009. *Plantas hortícolas enxertadas*. I Colóquio Nacional de Sementes e Viveiros. *Atas Portuguesas de Horticultura*, 15, 80-84.
- Ronquillo-Lopez, M. G.; Grau, C. R.; Nienhuis, J. 2010. Variation in reaction to *Fusarium* spp. identified in a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) population developed for field-based resistance to root rot and wilt. *Crop Sci.* 50, 2303-2309.
- Rouphael, Y., Schwaarz, D., Krumbein, A., Colla, G., 2010. Impact of grafting on product quality or fruit vegetables. *Scientia Hortivulturae*, 172-179.
- Salgado M. O.; Schwartz, H. F.; Brick, M. A., 1995. Inheritance of resistance to a Colorado race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. *Plant Dis.* 79, 279–281.
- Santin, R. C. M., 2008. Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, Brasil, 82pp.
- Santo, G. S.; Ponti, R. P., 1985. Host Suitability and Reaction of Bean and Pea Cultivars to *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla*. *Journal of Nematology*, v17, n.1, 77-79.
- Santos H. S., 2005. *Marcha de absorção de nutrientes em plantas de pimentão (Capsicum annuum, L.) enxertadas em porta-enxertos resistentes a patógenos de solo*. Botucatu,

Tese de Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

- Sasser, J. N.; Carter, C. C.; Hartman, K. M., 1984. Standardization of host suitability studies and reporting of resistance to root-knot nematodes. A Cooperative Publication Of The Department Of Plant Pathology, North Carolina State University and the United States Agency For International Development Raleigh, North Carolina, U.S.A.
- Silva, T., D., 2012. *Análise do perfil protéico em raiz de tomateiro submetido á inoculação com Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biociências, Recife, 50pp.
- Sydenham, G. M.; McSorley, R.; Dunn, R. A., 1996. Effects of Resistance in *Phaseolus vulgaris* in Development of *Meloidogyne* Species. *Journal of Nematologists*, v.28, n.4, 485-491.
- Taylor, A. L.; Sasser, J. N., 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). A Cooperative Publication Of The Department Of Plant Pathology, North Carolina State University and the United States Agency For International Development Raleigh, North Carolina, U.S.A.
- Teixeira, J. M. S., 2013. Avaliação do sistema de condução de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) enxertado em cultura protegida na produtividade e qualidade dos frutos. Dissertação de Mestrado em Agricultura Biológica, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, 61pp.
- Tihohod, D., 2000. *Nematologia agrícola aplicada*. 2ed. Jaboticabal: Funep, 473pp.
- Toyoda, K.; Hashimoto, H.; Utsumi, R.; Kobayashi, H.; Ouchi, S., 1988. Detoxification of fusaric acid by a fusaric acid-resistant mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its application to biological control of *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology*, St.Paul, v.78, n.11, 1307-1311.
- Trudgill D. L., Blok V. C., 2001 Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39, 53–77.
- Vieira, R.F.; Júnior, T. J., 2006. Sementes: veículos de disseminação de patógenos. In *Feijão*, Eds. Vieira, C.; Júnior, T.J.; Borém, A. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 600 pp.
- Voysest, O. V., 2000. *Mejoramiento genetico del frijol (phaseolus vulgaris L.) legado de variedades de américa latina (1930 – 1999)*. Ciat n.321, Cali, Colômbia, 195 pp.
- Wesemael, W. M. L.; Moens, M., 2011. Screening of common bean (*Phaseolus vulgaris*) for resistance against temperate root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Wiley Online Library*, 68, 702-708.
- Wesemael, W. M. L.; Viaene, N.; Moens, M., 2011. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. *Nematology*, Forum article, v.13, n.1, 3-16.
- White, T. J., T. D.; Bruns, S. B. Lee, J. W. Taylor., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. Eds, Innis, M. A, Gelfand, D. H, Sninsky, J. J, White, T. J. PCR – Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, CA, USA: Academic Press Inc.

- Widmer, T. L.; Mitkowski, N. A.; Abawi, G. S., 2002. Soil organic matter and management of plant-parasitic nematodes. In *Journal of Nematology* 34, 289–295.
- Willianson, V. M.; Hussey, R. S., 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell*, v. 8, 1735-1745.
- Yeates G. W., Bongers T, de Goede R. G. M., Freckman D. W., Georgieva S. S., 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera – an outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* 25, 315–331.

ANEXOS